

**OPTIMASI PERSENTASE PENAMBAHAN PELARUT
ETANOL DAN LAMA EKSTRAKSI TERHADAP KADAR
VANILIN HASIL BIODEGRADASI LIGNOSELULOSA POD
KAKAO MENGGUNAKAN JAMUR *Serpula lacrymans***

SKRIPSI

**Oleh:
AYU WINDA ARISKA
NIM 135100301111003**



**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**OPTIMASI PERSENTASE PENAMBAHAN PELARUT
ETANOL DAN LAMA EKSTRAKSI TERHADAP KADAR
VANILIN HASIL BIODEGRADASI LIGNOSELULOSA POD
KAKAO MENGGUNAKAN JAMUR *Serpula lacrymans***

**Oleh:
AYU WINDA ARISKA
NIM 135100301111003**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknik**



**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul TA : Optimasi Persentase Penambahan Pelarut Etanol dan Lama Ekstraksi Terhadap Kadar Vanilin Hasil Biodegradasi Lignoselulosa Pod Kakao Menggunakan Jamur *Serpula lacrymans*

Nama Mahasiswa : Ayu Winda Ariska

NIM : 135100301111003

Jurusan : Teknologi Industri Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Pembimbing Pertama,



Imia Nurka, STP, MP, PhD.

NIP. 19740526 199903 2 001

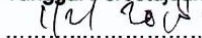
Pembimbing Kedua,



Dr. Ir. Nur Hidayat, MP

NIP. 19610223 198701 1 001

Tanggal Persetujuan:


.....

Tanggal Persetujuan:

.....

LEMBAR PENGESAHAN

Judul TA : Optimasi Persentase Penambahan Pelarut Etanol dan Lama Ekstraksi Terhadap Kadar Vanilin Hasil Biodegradasi Lignoselulosa Pod Kakao Menggunakan Jamur *Serpula lacrymans*
Nama Mahasiswa : Ayu Winda Ariska
NIM : 135100301111003
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,

Suprayogi, STP, MP, PhD.

NIP. 19760825 200312 1 002

Dosen Penguji II,

Irma Nurika STP, MP, PhD.

NIP. 19740526 199903 2 001

Dosen Penguji III,

Dr. Ir. Nur Hidayat MP.

NIP. 19610223 198701 1 001



Ketua Jurusan,

Dr. Sucipto, STP, MP

NIP. 197306021999031001

Tanggal Lulus TA:.....

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Lumajang pada 01 Januari 1995 sebagai anak pertama dari pasangan Bapak Wiyono dan Ibu Ismiatul Khoirah. Penulis menempuh pendidikan di SDN 2 Kedawung (2001-2007), SMPN 2 Sukodono (2007-2010), dan SMA PGRI 1 Lumajang (2010-2013). Tahun 2012 penulis diterima di Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian (FTP) Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2017 penulis lulus sebagai Sarjana Teknologi Pertanian.

Selama menempuh pendidikan di SMPN 2 Sukodono penulis aktif dalam kegiatan ekstrakurikuler Marching Band dan Kepengurusan OSIS. Pada jenjang perguruan tinggi, penulis aktif mengikuti Lembaga Kegiatan Mahasiswa (LKM) Forum Kajian Islam (FORKITA) tahun 2013-2014 menjadi staf bidang Kaderisasi, tahun 2015-2016 menjadi pengurus harian FORKITA sebagai sekretaris. Pada tahun 2014-2016 penulis aktif mengikuti Lembaga Kegiatan Mahasiswa *Agritech Research Study Club* (ARSC) sebagai staf Pengembangan Sumber Daya Manusia (PSDM). Selama di LKM penulis aktif mengikuti kegiatan kepanitian Seminar baik tingkat Fakultas dan Universitas. Pada tahun 2017 penulis bergabung pada research group bimbingan Ibu Irnia Nurika STP, MP, Ph.D untuk melaksanakan proyek penelitian tahun ke-3 yang dibiayai melalui Bantuan Operasional PTN (BOPTN) DIKTI 2017 Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi.

*Alhamdulillah.....
Segala Puji bagi Allah SWT atas segala nikmat-Nya*

*karya tulis ini saya persembahkan untuk
Ayah, Ibu, Kakek dan Nenek yang Kusayangi
terima kasih Do'a, kasih sayang, perhatian dan ketulusannya*

*Semoga ilmu yang diperoleh bisa bermanfaat untuk orang lain
dan menjadi amal baik untuk "Ayah, Ibu, Kakek, Nenek, dan
Guru-guruku" yang selama ini telah memberiku banyak
pengalaman hidup dan ilmu.*

*terima kasih untuk teman satu tim proyek
skripsi "Lignocellulose Project":
Afiq, Dwi, Himawan yang selalu membantu dan bekerjasama
untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan laporan*

*terima kasih untuk teman-teman, sahabatku dan kakak tingkat
se-tim proyek kak cikal, mbak fillah, mbak nurul, mbak dini dan
mbak novii telah memberikan doa, semangat dan dukungan*

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama Mahasiswa : Ayu Winda Ariska
NIM : 135100301111003
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul TA : Optimasi Persentase Penambahan Pelarut Etanol dan
Lama Ekstraksi Terhadap Kadar Vanilin Hasil
Biodegradasi Lignoselulosa Pod Kakao Menggunakan
Jamur *Serpula lacrymans*

Menyatakan bahwa,

TA dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas. Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, 1 Februari 2018
Pembuat Pernyataan,



Ayu Winda Ariska
NIM. 135100301111003

AYU WINDA ARISKA. 135100301111003. Optimasi Persentase Penambahan Pelarut Etanol Dan Lama Ekstraksi Terhadap Kadar Vanilin Hasil Biodegradasi Lignoselulosa Pod Kakao Menggunakan Jamur *Serpula lacrymans*. TA. Pembimbing: Irnia Nurika, STP, MP, PhD. dan Dr. Ir. Nur Hidayat, MP.

RINGKASAN

Pod kakao merupakan limbah pertanian yang dapat dikonversi menjadi senyawa aromatik dengan memanfaatkan senyawa lignoselulosa seperti senyawa selulosa, hemiselulosa dan lignin. Pemecahan lignin menghasilkan senyawa dengan nilai tambah tinggi seperti senyawa vanillin, untuk memecah lignoselulosa perlu dilakukan *pretreatment* menggunakan jamur pelapuk *Serpula lacrymans*. Selain dihasilkan dari isolasi buah vanilla sebagian besar kebutuhan vanillin dibuat secara sintesis. Maka dari itu perlu adanya pendekatan secara bioteknologi untuk menghasilkan senyawa vanillin dengan memanfaatkan senyawa lignoselulosa pada limbah pod kakao.

Penelitian ini menggunakan metode *response surface method* (RSM) rancangan komposit terpusat. Percobaan menggunakan dua faktor yaitu persentase penambahan pelarut etanol dan lama ekstraksi dengan respon persentase kadar vanillin dan fenol larut etanol. Hasil solusi optimal menunjukkan perlakuan optimal diperoleh pada penambahan volume pelarut etanol 41,17 ml (41,17%) dan lama ekstraksi 243,54 menit dengan respon kadar vanillin yang diprediksi 0,43% dan fenol terlarut etanol sebesar 1,84($\mu\text{g/g}$). Hasil deteksi menggunakan LC-ESI-MS/MS pada sampel ekstrak pod kakao dengan kondisi optimal menunjukkan ditemukan isomer vanillin yang diduga senyawa isovanilin.

Kata Kunci: Vanilin, Pod Kakao, Optimasi, Esktraksi, Pelarut Etanol, Lama Ekstraksi.

Summary

*Cocoa pod is an agricultural waste that can be converted into aromatic compounds by utilizing lignocellulosic such as cellulose, hemicellulose and lignin. Biological pretreatment by *Serpula lacrymans* can be used to lignin degradation. Its can produce the chemical derivatives from lignin, such as vanillin. Besides being produced from vanilla insulation, most of vanillin are made synthetically. Therefore, it is necessary to approach biotechnology to produce vanillin by utilizing lignocellulosic compounds in waste cocoa pods.*

This research is used Response Surface Method (RSM) with centralized composite design. The experimental used two factors: percentage of ethanol solvent addition and extraction time, lignocellulose parameter used as response was percentage of vanillin content and soluble ethanol solvent of phenol. The optimal solution result showed that the optimum treatment was obtained at the addition of 41,17 ml ethanol (41.17%) solvent volume and 243,54 min length of extraction with estimated vanillin content rate of 0.43% and ethanol soluble phenol of 1.84 ($\mu\text{g} / \text{g}$). Detection results using LC-ESI-MS / MS on the presence of vanillin in samples with optimal conditions showed detected vanillin isomer suspected iso-vanillin.

Keywords : *Ethanol, Extraction Time, Lignin, Vanillin, *Serpula lacrymans**

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian dengan judul “**Optimasi Produksi Bioetanol Dan Senyawa Aromatik Melalui Biokonversi Lignoselulosa Dari Limbah Hasil Pertanian (*Biomass*) Menggunakan Isolat Jamur (*Brown Rot* dan *White Rot*)**” untuk tahun ke-3 yang dibiayai melalui Bantuan Operasional PTN (BOPTN) DIKTI 2016 Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT karena atas rahmat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Optimasi Persentase Penambahan Pelarut Etanol dan Lama Ekstraksi Terhadap Kadar Vanilin Hasil Biodegradasi Lignoselulosa Pod Kakao Menggunakan Jamur *Serpula lacrymans*” dengan baik. Penyusunan TA ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian.

Pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih kepada:

- 1 Kedua orang tua dan segenap keluarga yang banyak memberi dukungannya dan doa.
- 2 Ibu Irnia Nurika STP,MP, Ph.D selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktunya dan membimbing penulis sehingga dapat menyelesaikan laporan ini
- 3 Bapak Dr.Ir. Nur Hidayat, MP. selaku selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktunya dan membimbing penulis sehingga dapat menyelesaikan laporan ini
- 4 Bapak Suprayogi STP, MP, Ph.D selaku selaku dosen penguji yang meberikan saran perbaikan untuk laporan ini
- 5 Dr. Sucipto, STP, MP selaku ketua jurusan Teknologi Industri Pertanian Universitas Brawijaya
- 6 Seluruh teman-teman yang telah memberikan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan ini.
- 7 Pihak-pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan laporan ini.

Penyusun menyadari adanya keterbatasan pengetahuan, referensi dan pengalaman dalam pembuatan laporan ini. Penyusun mengharapkan saran dan masukan demi lebih baiknya TA ini.

Malang, 25 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	5
2.2 Lignoselulosa	6
2.2.1 Selulosa	7
2.2.2 Hemiselulosa	8
2.2.3 Lignin	9
2.3 Vanilin	10
2.4 Isomer Vanilin	11
2.5 <i>Pretreatment</i> Lignoselulosa Secara Biologi	12
2.6 <i>Serpula lacrymans</i>	13
2.7 Ekstraksi	14
2.7.1 Volume Pelarut Etanol dan Lama Ekstraksi	15
2.7.2 Polaritas.....	16
2.8 Evaporasi	17
2.9 <i>Response Surface Method</i>	18
2.10 Penelitian Terdahulu	18
2.11 Hipotesa	19

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.2.1 Alat	20
3.2.2 Bahan	20
3.3 Rancangan Penelitian	20
3.4 Batasan Penelitian	23
3.5 Pelaksanaan Penelitian	23
3.5.1 Preparasi Bahan dan Mikroorganisme	24
3.5.2 <i>Pretreatment</i> Pod Kakao	27
3.5.3 Pengujian Total Gula Reduksi (TGR)	27
3.5.4 Ekstraksi Menggunakan Aquades	28
3.5.5 Pengujian <i>Total Soluble Phenol</i> (Pelarut Aquades).....	29
3.5.6 Ekstraksi Vanilin dari Ampas Pod Kakao (Pelarut Etanol).....	30
3.5.7 Pengukuran Kadar Vanilin Substrat Ampas Pod Kakao.....	31
3.5.8 Persentase Susut Berat Kering.....	31
3.6 Optimasi Persentase Pelarut Etanol dan Lama Ekstraksi	32
3.7 Pengolahan Analisis Data	34

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstrak Pod Kakao Pada Pelarut Aquades.....	35
4.1.1 Total Gula Reduksi	35
4.1.2 <i>Total Soluble Phenol</i> (TSP).....	36
4.1.3 pH.....	37
4.2.2 Persentase Susut Berat Kering	39
4.2 Hasil Analisa Desain Komposit Terpusat.....	40
4.2.1 Analisa Respon Kadar Vanilin.....	40
4.2.2 Analisa Respon Fenol larut etanol	43
4.3 Optimasi Respon Kadar Vanilin dan Fenol terlarut menggunakan pelarut etanol	46
4.4 Deteksi Keberadaan Vanilin	48

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53

DAFTAR PUSTAKA	54
-----------------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi Kimia Pod Kakao	5
Tabel 2.2	Indeks Polaritas Pelarut Organik.....	17
Tabel 3.1	Tarif Level Faktor	21
Tabel 3.2	Rancangan Percobaan Ekstraksi Vanilin berdasarkan <i>Response Surface Method</i>	22
Tabel 3.3	Titik Komposit Terpusat <i>Surface Method</i>	22
Tabel 4.1	Data Optimasi Respon Persentase Kadar Vanilin Hasil Ekstraksi Ampas Pod Kakao oleh Jamur <i>Serpula lacrymans</i>	40
Tabel 4.2	Data Optimasi Respon Persentase Fenol terlarut Etanol Hasil Ekstraksi Ampas Pod Kakao oleh Jamur <i>Serpula lacrymans</i>	44
Tabel 4.3	Optimasi Respon Kadar Vanilin dan Fenol Terlarut Etanol	46
Tabel 4.4	Solusi Hasil Optimal	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema Lignoselulosa.....	6
Gambar 2.2	Struktur Molekul Selulosa	8
Gambar 2.3	Unit-unit Hemiselulosa	8
Gambar 2.4	Struktur Kimia Monomer Lignin	8
Gambar 2.5	Struktur Kimia Vanilin.....	10
Gambar 2.6	Struktur Vanilin dan Isovanilin	11
Gambar 2.7	Pengaruh <i>Pretreatment</i> Lignoselulosa.....	12
Gambar 3.1	Diagram Alir Tahapan Penelitian	23
Gambar 4.1	Rata-rata TGR Pod Kakao oleh Jamur <i>S.lacrymans</i>	35
Gambar 4.2	Rata-rata TSP Pod Kakao oleh Jamur <i>S.lacrymans</i>	36
Gambar 4.3	Rata-rata pH Pod Kakao oleh Jamur <i>S. lacrymans</i>	38
Gambar 4.4	Rata-rata Persentase Susut Berat Kering Pod Kakao oleh Jamur <i>S.lacrymans</i>	39
Gambar 4.5	Plot Tiga Dimensi Respon Permukaan Kadar Vanillin	42
Gambar 4.6	Plot Tiga Dimensi Respon Larut Etanol	48
Gambar 4.7	Hasil Kromatogram Standar Vanilin.....	49
Gambar 4.8	Hasil Kromatogram Sampel Pod Kakao	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Tahapan Kegiatan Pelaksanaan	65
Lampiran 2	Flow Chart Pembuatan <i>Malt Extract Agar</i> (MEA)	67
Lampiran 3	Diagram Alir Pembuatan <i>Grain Spawn</i>	68
Lampiran 4	<i>Flow chart treatment</i> dan Inokulasi pada Pod Kakao.....	69
Lampiran 5	Ekstraksi Menggunakan Aquades	70
Lampiran 6	Pembuatan Larutan Asam Galat dan Sodium Karbonat	71
Lampiran 7	Pengukuran Absorbansi Standar Fenol	72
Lampiran 8	Pembuatan dan Pengukuran Fenol pada Ekstrak Pod Kakao.....	73
Lampiran 9	Ekstraksi Menggunakan Etanol	74
Lampiran 10	Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Vanillin.....	75
Lampiran 11	Pengukuran Vanillin Pada Ekstrak Pod Kakao.....	76
Lampiran 12	Pembuatan Larutan Glukosa, DNS, DNS Glukosa, DNS Aquades	77
Lampiran 13	Pembuatan dan Pengukuran Larutan Standar Gula Reduksi	79
Lampiran 14	Pengukuran Total Gula Reduksi pada Sampel Ekstrak Pod Kakao	80
Lampiran 15	Data Nilai TSP Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur <i>Serpula lacrymans</i> Tiap 7 hari selama 35 hari Inkubasi	81
Lampiran 16	Data Nilai TGR Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur <i>Serpula lacrymans</i> Tiap 7 hari selama 35 hari Inkubasi.....	82
Lampiran 17	Data Nilai pH Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur <i>Serpula lacrymans</i> Tiap 7 hari selama 35 hari Inkubasi.....	83
Lampiran 18	Data Nilai Susut Berat Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur <i>Serpula lacrymans</i> Tiap	

	7 hari selama 35 hari Inkubasi	84
Lampiran 19	Hasil <i>Fit Summary</i> dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat	85
Lampiran 20	Penentuan Kriteria Faktor dan Respon.....	89
Lampiran 21	Hasil Analisis Kromatogram LC-ESI-MS/MS Standar Vanilli.....	90
Lampiran 22	Hasil Analisis Kromatogram LC-ESI-MS/MS Sampel.....	91
Lampiran 23	Dokumentasi Penelitian.....	92

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Vanilin merupakan senyawa yang terkandung pada tanaman vanili (*Vanili planifolia*) (Sjostrom, 2008). Vanilin secara luas digunakan sebagai *flavouring agent* pada industri pangan di bidang pengawetan pangan, vanillin dipakai sebagai anti mikroba dan antioksidan (Theresia, 2009). Selama ini vanillin alami hanya dapat memenuhi permintaan pasar kurang dari 1% (Sciubba *et al.*, 2009). Hal tersebut dikarenakan kebutuhan dunia akan bahan pengharum semakin tinggi sehingga selain dihasilkan dari isolasi buah vanilla sebagian besar kebutuhan vanillin dibuat secara sintetis (Suwarso dkk, 2002). Maka dari itu untuk memenuhi kebutuhan vanillin yang semakin meningkat perlu adanya pendekatan secara bioteknologi untuk menghasilkan senyawa aromatik vanillin alami dengan memanfaatkan ketersediaan bahan baku yang melimpah seperti potensi limbah pertanian. Salah satu limbah pertanian di Indonesia yang berpotensi untuk dimanfaatkan adalah limbah pod kakao yang dihasilkan dari buah kakao.

Potensi limbah pod kakao di Indonesia sekitar 3,5 juta ton per tahun (Cruz *et al.*, 2012). Meningkatnya kebutuhan biji kakao di Indonesia sejalan dengan peningkatan limbah yang dihasilkan akan tetapi pemanfaatannya masih sangat terbatas (Perez *et al.*, 2002). Limbah sebanyak ini berasal dari produksi tahun 2015 yang mencapai 779,5 ton/tahun (Anonim, 2015). Besarnya jumlah limbah tersebut dapat dimanfaatkan untuk bahan baku biokonversi dengan memanfaatkan senyawa kimia yang ada pada pod kakao. Limbah pod kakao mengandung beberapa senyawa kimia seperti lignoselulosa. Lignoselulosa terdiri dari tiga komponen utama yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin (Perez *et al.*, 2002). Pod kakao memiliki kandungan selulosa 24,24%, hemiselulosa 8,72% dan lignin 26,38% (Offori *et al.*, 2013). Sifat limbah pod kakao yang mengandung lignoselulosa cukup tinggi sangat berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku biokonversi senyawa aromatik seperti senyawa vanilin dengan menggunakan agen pendegradasi lignoselulosa seperti jamur pelapuk (Kim *et al.*, 2014).

Banyak jenis jamur pelapuk yang digunakan untuk mendegradasi lignoselulosa diantaranya adalah jamur pelapuk coklat (*Brown rot*). Kelebihan penggunaan jamur pelapuk coklat yaitu dapat menghasilkan hidroksi radikal dari reaksi Fenton untuk mendegradasi berbagai substrat (Kim *et al.*, 2014). Jamur pelapuk coklat dapat memodifikasi struktur lignin dan mendegradasi senyawa selulosa dan hemiselulosa yang membuat struktur bahan lebih sederhana dan mudah mengalami proses pirolisis aromatik (Fan *et al.*, 2011). Senyawa aromatik yang dihasilkan melalui konversi lignin salah satunya seperti senyawa yang diduga vanillin (Jong *et al.*, 2014). Salah satu cara untuk mendapatkan vanillin hasil konversi lignin dapat dilakukan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi senyawa fenolik seperti vanilin dari limbah pertanian sangat penting dilakukan untuk menambah nilai produk samping yang terbarukan (Buranov dan Mazza, 2009). Kadar vanillin sendiri dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kadar vanillin yaitu volume pelarut dan lama ekstraksi untuk melarutkan vanillin (Dey *et al.*, 2014).

Volume pelarut yang optimal dapat mempengaruhi dinding sel bahan, permeabilitas jaringan dinding sel meningkat sehingga perpindahan masa ke pelarut lebih cepat, selain itu volume pelarut juga meningkatkan luas kontak permukaan antara fase padat dan fase cair pada saat ekstraksi (Dong *et al.*, 2014). Kepolaran pelarut juga mempengaruhi tingkat kelarutan suatu senyawa bahan yang diekstraksi ke dalam pelarut. Gugus aldehida (-CHO) pada vanillin cenderung bersifat polar (Purwono, 2007). Jenis dan tingkat kepolaran pelarut menentukan jenis dan jumlah senyawa yang dapat diekstrak dari bahan. Pelarut akan mengekstrak senyawa yang mempunyai kepolaran yang sama atau mirip dengan kepolaran pelarut yang digunakan (Pendit, 2016). Etanol merupakan pelarut organik yang cenderung polar (Marnoto, 2012).

Pelarut etanol dapat melarutkan senyawa vanillin dan meningkatkan kadar vanillin pada *Vanilla planifolia* Dong *et al* (2014). Etanol merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi senyawa polifenol dan memberikan ekstrabilitas yang baik (Dey, 2014). Selain volume pelarut, faktor lain yang mempengaruhi kadar vanillin yaitu lama waktu ekstraksi dimana waktu ekstraksi

dengan waktu tertentu akan menyebabkan celah-celah bahan mengembang di dalam sel. Secara signifikan transfer massa dari bahan ke pelarut lebih banyak karena waktu kontak antara bahan dan pelarut lebih lama (Rasomandary *et al.*, 2013). Semakin lama waktu ekstraksi, kuantitas bahan yang terekstrak semakin meningkat dikarenakan kesempatan untuk bersentuhan antara bahan dengan pelarut makin besar sehingga hasilnya akan bertambah sampai titik jenuh larutan (Mandal, 2007). Akan tetapi terlalu lama waktu ekstraksi juga dapat menyebabkan bahan mengalami kavitasi yaitu meningkatkan transfer massa dari fase cair ke fase uap sehingga perlu adanya titik optimal lama waktu ekstraksi terhadap vanillin.

Menurut Dey (2014) pada penelitiannya volume pelarut dapat melarutkan TPC (*Total phenolic compound*) secara maksimal pada gandum. Ekstraksi menggunakan pelarut etanol dengan volume pelarut 10 ml sampai 20 ml. Nilai TPC terus mengalami kenaikan seiring bertambahnya volume pelarut. Selanjutnya Matin (2017) melakukan proses ekstraksi senyawa fenolik dari buah delima Iran (*Punica granatum*). Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 2, 4 dan 6 jam, waktu optimal diperoleh antara rentang 2 sampai 6 jam untuk ekstraksi fenolik buah delima. Maka dari itu perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai volume pelarut dan lama waktu ekstraksi yang optimal pada ekstraksi pod kakao untuk meningkatkan kandungan yang diduga kadar vanillin pada limbah pertanian yang mengandung lignoselulosa.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa proporsi penambahan volume pelarut etanol dan lama ekstraksi sehingga diperoleh kadar vanillin hasil degradasi lignoselulosa pod kakao oleh jamur *Serpula lacrymans* dengan kondisi optimal.
2. Apakah terdapat senyawa vanillin pada hasil degradasi lignoselulosa pod kakao oleh jamur *Serpula lacrymans*.

1.3 Tujuan

1. Mengetahui proporsi penambahan volume pelarut etanol dan lama ekstraksi sehingga diperoleh kadar vanillin hasil

degradasi lignoselulosa pod kakao oleh jamur *Serpula lacrymans* dengan kondisi optimal.

2. Mendeteksi ada atau tidaknya senyawa vanillin pada hasil degradasi lignoselulosa pod kakao oleh jamur *Serpula lacrymans*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memperoleh informasi pengaruh volume pelarut dan lama ekstraksi terhadap kadar senyawa yang diduga vanillin.
2. Meningkatkan penggunaan jamur pelapuk coklat *Serpula lacrymans* sebagai agen pendegradasi.
3. Memperoleh informasi keberadaan vanillin dalam pod kakao.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman yang dapat tumbuh di wilayah hujan tropis (Mulyono, 2010). Tanaman kakao rata-rata memiliki tinggi 1,8 sampai dengan 3 meter ketika berumur tiga tahun dan akan mencapai tinggi 4,5 sampai 7 meter ketika berumur 12 tahun. Tinggi tanaman yang beragam dipengaruhi oleh intensitas naungan dan faktor-faktor tumbuh yang tersedia (Rahardjo, 2011). Tanaman kakao selama ini dimanfaatkan untuk diambil biji buahnya. Buah kakao akan masak setelah berumur 5 sampai 6 bulan tergantung kondisi tempat penanaman (Prawoto, 2010). Kakao dibagi tiga kelompok besar yaitu *cricollo*, *forastero*, dan *trinitario* (Lukito, 2012). Permukaan kulit buah *cricollo* kasar dan alurnya jelas. Kulitnya tebal tetapi agak lunak sehingga mudah dipecah sedangkan kakao *forestero* termasuk kelompok kakao lindak (bulk) (Yunianti, 2012). Kelompok kakao *trinitario* merupakan hibrida *cricollo* dengan *forestero*, dalam penentuan kelompok *trinitario* dapat masuk ke dalam kakao *cricollo* (mulia) dan lindak, bergantung pada mutu bijinya (Iswanto, 2008). Varietas *criollo* menghasilkan biji cokelat yang mutunya sangat baik, varietas *forestero* menghasilkan biji cokelat yang mutunya sedang dan varietas *trinitario* yang menghasilkan biji kakao hasil perkawinan dari jenis *criollo* dan *forestero* (Mulyono, 2010). Komposisi kimia dan mineral pod kakao dapat dilihat pada Tabel 2.1.

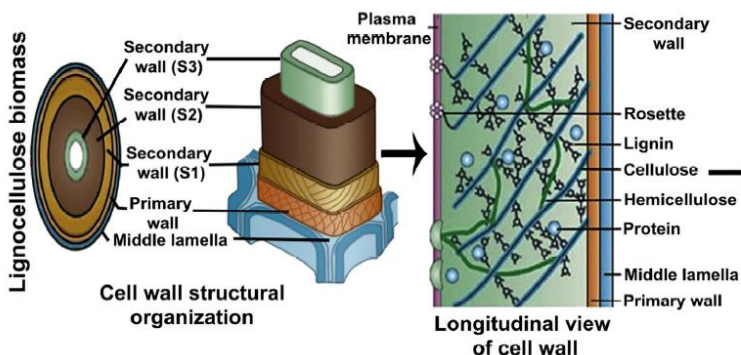
Tabel 2.1 Komposisi Kimia Pod Kakao

Komposisi	Kadar (g/100 g)	Referensi
Bahan kering (%)	89,5	Tuah <i>et al.</i> , (2015)
Asam serat	50,62	Tuah <i>et al.</i> , (2015)
Abu	10,02	Afrane, (2013)
Lignin	26,38	Onifade, (2011)
Selulosa	24,24	Onifade, (2011)
Hemiselulosa	8,72	Onifade, (2011)
Nitrogen	1,12	Afrane, (2013)
Protein Kasar	10,74	Simpson <i>et al.</i> , (2011)
Potassium (%)	43,85	Afrane, (2013)
		Simpson <i>et al.</i> , (2011)
Theobromine	0,34	Tuah <i>et al.</i> , (2015)

Pod kakao mengandung senyawa kimia seperti senyawa lignoselulosa. Komponen utama dari lignoselulosa yaitu selulosa, diikuti oleh hemiselulosa dan lignin (Prasad, 2007). Fraksi lignin termasuk senyawa aromatik dari dinding sel tanaman yang dapat menghasilkan berbagai senyawa sederhana, seperti fenol atau vanilin sehingga vanillin yang dihasilkan nantinya dapat dimanfaatkan sebagai senyawa fenol terbarukan (Savy, 2015).

2.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa adalah komponen utama dari biomassa, yang terdiri dari sekitar setengah dari materi tanaman yang dihasilkan oleh proses fotosintesis. Lignoselulosa merupakan energi terbarukan yang paling berlimpah. Lignoselulosa terdiri dari tiga jenis polimer, selulosa, hemiselulosa dan lignin (Perez *et al.*, 2002). Lignoselulosa dapat diklasifikasikan dalam empat kelompok berdasarkan jenis sumber daya yaitu residu hutan atau perkebunan, limbah padat, limbah kertas, dan sumber sisa tanaman (Balat, 2011). Pod kakao termasuk dalam limbah perkebunan yang memiliki kandungan selulosa sebesar 24,24%, hemiselulosa 8,72% dan lignin sebesar 26,38% (Offori *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 Skema Lignoselulosa (Manavalan, 2015)

Komponen utama dari lignoselulosa adalah selulosa, diikuti oleh hemiselulosa dan lignin (**Gambar 2.1**). Komposisi dan proporsi senyawa tersebut berbeda pada setiap tanaman (Prasad, 2007). Pada dasarnya senyawa lignoselulosa terdiri

dari karbohidrat (gula c-5 dan c-6) yang diperangkap oleh lignin. Selulosa, hemiselulosa dan lignin bersama dengan abu membentuk struktur lignoselulosa kompleks. Kompleksitas struktural hemiselulosa (c-5 dan c-6 gula kompleks), lignin, struktur kristal selulosa (polimer β -1,4-glukosa) dan pektin membuat lignoselulosa sangat larut dalam beberapa jenis pelarut (Hamelinck *et al.*, 2005). Sifat kimia dari komponen lignoselulosa dapat dijadikan sebagai substrat dengan nilai bioteknologi yang besar (Malherbe dan Cloete, 2003).

Senyawa lignoselulosa dibutuhkan untuk sumber energi sebagai bahan kimia yang ramah lingkungan. Selulosa dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku untuk etanol dengan serangkaian proses enzimatik sedangkan hemiselulosa dapat dimanfaatkan sebagai bahan aditif makanan. Fraksi lignin termasuk senyawa aromatik dari dinding sel tanaman yang dapat menghasilkan berbagai senyawa sederhana, seperti fenol atau vanilin (Savy, 2015). Lignin termasuk senyawa tiga dimensi disusun dari monomer metoksifenil propane, lignin terdapat di lamela tengah dan berfungsi sebagai pengikat antar sel serta menguatkan dinding sel (Sasmita, 2010).

2.2.1 Selulosa

Selulosa adalah polimer linear yang terdiri dari D-glukosa sub unit yang dihubungkan β -1,4 glikosidik obligasi membentuk dimer selobiosa. rantai ini bentuk panjang (atau fibril elemental) terikat oleh ikatan hidrogen (Perez *et al.*, 2002). Pod kakao memiliki selulosa sebesar 24,24% (Offori *et al.*, 2013). Selulosa termasuk komponen utama dari lignoselulosa yang terdiri dari unit monomer glukosa (Hunt, 2015). Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis, di alam biasanya selulosa berikatan dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Holtzapple *et al.*, 2005). Struktur molekul selulosa dapat dilihat pada **Gambar 2.2**.

Selulosa hadir sebagai bentuk kristal dan sejumlah kecil rantai selulosa membentuk selulosa amorf. Selulosa lebih rentan terhadap degradasi enzimatik. Selulosa muncul di alam terikat dengan senyawa lain dalam tanaman dan hubungan ini dapat mempengaruhi biodegradasinya (Perez *et al.*, 2002).

The diagram illustrates the chemical structure of a cellulose unit, which is a repeating unit of glucose rings linked by β -1,4 glycosidic bonds. The central glucose unit is highlighted with a bracket and labeled "Cellulose unit". The carbons in this unit are numbered 1 through 6. The structure shows the hydroxyl groups and hydroxymethyl groups attached to the rings.

2.2.2 Hemiselulosa

Diagram illustrating the structure of a glucose molecule and its various glycosidic linkages:

- The top structure shows a glucose molecule in its cyclic form, with labels for the anomers: **Equatorial** (pointing to the C1 position) and **axial** (pointing to the C4 position).
- The bottom row shows four different glycosidic linkages, all labeled **$\beta 1 \rightarrow 4$** :
 - $\beta 1 \rightarrow 4$ glucan**: A glucose molecule linked to another glucose molecule.
 - $\beta 1 \rightarrow 4$ xylan**: A glucose molecule linked to a xylan molecule.
 - $\beta 1 \rightarrow 4$ glucomannan**: A glucose molecule linked to a glucomannan molecule.
 - $\beta 1 \rightarrow 4$ mannan**: A glucose molecule linked to a mannan molecule.

8

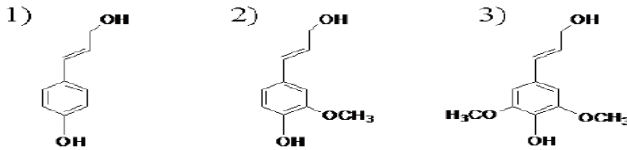
Pod kakao mengandung hemiselulosa sekitar 8,72% (Ofori, 2013). Kandungan hemiselulosa pada pod kakao terbesar ketiga setelah kandungan selulosa. Pada dasarnya lignoselulosa terdiri dari karbohidrat (gula c-5 dan c-6) yang diperangkap oleh lignin. Selulosa, hemiselulosa, dan lignin bersama dengan abu membentuk struktur lignoselulosa yang kompleks. Kompleksitas struktural hemiselulosa (c-5 dan c-6 gula kompleks), lignin, struktur kristal selulosa (polimer β -1,4-glukosa) dan pektin membuat lignoselulosa sangat larut (Hamelinck *et al.*, 2005). Hemiselulosa dapat dimanfaatkan sebagai bahan aditif makanan (Savy, 2015). Berbeda dengan selulosa, hemiselulosa adalah polisakarida bercabang heterogen yang mengikat erat, tetapi non-kovalen. Hemiselulosa berbeda dari selulosa, terutama terdiri dari xilosa dan lima karbon monosakarida lainnya (McKendry, 2002).

2.2.3 Lignin

Lignin merupakan senyawa amorf yang berada di lamella tengah dan dinding sekunder. Konsentrasi lignin dalam lamella tengah lebih tinggi dibandingkan pada lapisan dinding sekunder. Fungsi lignin yaitu sebagai perekat sel-sel dalam kayu dan memberikan ketegaran pada sel (Sasmita, 2010). Lignin adalah salah satu polimer yang paling melimpah di alam dan terdapat dalam dinding sel (Aloisio *et al.*, 2014). Konversi lignin dapat menghasilkan beberapa senyawa aromatik *monophenolic* salah satunya seperti senyawa yang diduga vanillin (Jong *et al.*, 2014). Senyawa *monophenolic* termasuk guaiasil (vanillin, *vanillic acid*, *acetovanillone*, *ferulic acid*), *syringyl* (syringal dehyde, asam syringic, asetosiringon), dan parahydroxyphenyl (asam p-hidroksibenzoat, asam p-coumaric, p-hidroksi benzal-dehida) (Punt *et al.*, 2013). Struktur kimia monomer lignin dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.

Lignin adalah bagian utama dari dinding sel tanaman terbanyak setelah selulosa. Lignin merupakan polimer aromatik yang berikatan bersama polisakarida pada dinding sel sekunder tanaman dan terdapat sekitar 20-40%. Komponen lignin pada sel tanaman (monomer guasil dan siringil) berpengaruh terhadap pelepasan dan hidrolisis polisakarida (Anindyawati, 2009). Lignin merupakan biopolimer yang heterogen pada

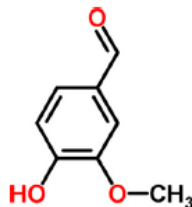
lignoselulosa yang dibentuk oleh radikal oksidatif yang dimediasi oleh unit fenil propana- dan dihubungkan melalui berbagai jenis eter dan karbon-karbon obligasi (Malherbe, 2003).



Gambar 2.4 Struktur Kimia Monomer Lignin: (1) p-coumaryl alcohol; (2) coniferyl alcohol; dan (3) sinapyl alcohol (Perez *et al.*, 2002)

2.3 Vanilin

Vanilin merupakan senyawa yang terkandung pada tanaman vanili (*Vanili planifolia*) dan termasuk kelompok senyawa fenolik sederhana dengan rumus kimia C₈H₈O₃. Vanilin dapat diperoleh dari tanaman vanili yang diekstrak dengan pelarut etanol atau dari kayu lunak yang dioksidasi dengan nitrobenzena dalam alkali. Vanilin juga dapat diperoleh dari degradasi oksidatif lignin dalam suasana basa dan diperoleh hasil 21-23% (Sjostrom, 2008). juga telah berhasil mensintesis vanilin dari degradasi kurkumin yang diperoleh dari ekstrak kunyit. Secara komersial vanillin banyak tersedia di pasaran. Vanilin secara luas digunakan sebagai *flavouring agent* pada industri pangan. Vanillin tidak hanya dimanfaatkan sebagai flavor tetapi juga sebagai bahan obat-obatan dan bahan tambahan parfum. Rumus struktur vanilin dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



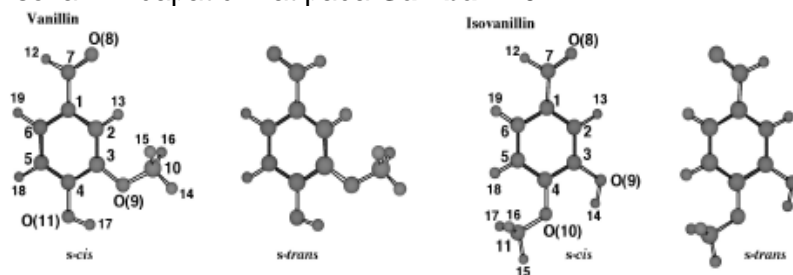
Gambar 2.5 Struktur Kimia Vanilin (Shakeel *et al.*, 2015)

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida) merupakan aldehida yang mempunyai gugus benzen, hidroksil, dan

metoksi. Biokonversi senyawa aromatik kebanyakan diperoleh dengan cara proses ekstraksi menggunakan pelarut seperti aquades. Namun, banyak dari prekursor *compound aroma* atau produk beraroma tidak selalu larut dalam air (Cantone *et al*, 2007). Gugus karbonil pada vanilin cenderung bersifat polar. polaritas vanilin cenderung bersifat polar dibanding dari senyawa lainnya. Gugus aldehida (-CHO) cenderung bersifat polar sehingga vanilin kurang larut dalam lemak (Purwono, 2007). Vanilin larut pada beberapa *solvent* seperti etanol yang mempunyai kelarutan relatif tinggi dan bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Berat molekul vanillin 152,149 g/mol. Etanol memiliki titik didih yang rendah 65°C dan vanillin memiliki titik didih yang tinggi 285°C sehingga memudahkan proses pemisahan (Mukhriani, 2012).

2.4 Isomer Vanilin

Isomer adalah suatu senyawa dari beberapa senyawa yang mempunyai rumus molekul sama, tetapi mempunyai sifat berbeda akibat perbedaan susunan atom-atomnya. Dengan kata lain, isomer adalah suatu senyawa dari beberapa senyawa berbeda yang mempunyai rumus molekul sama dan masa molekul sama tetapi struktur kimianya berbeda (Sardjono, 2008). Salah satu jenis isomer vanillin yaitu isovanilin (Abuirmeh *et al.*, 2015). Perbedaan rumus struktur vanilin dan isovanilin dapat dilihat pada **Gambar 2.6**.



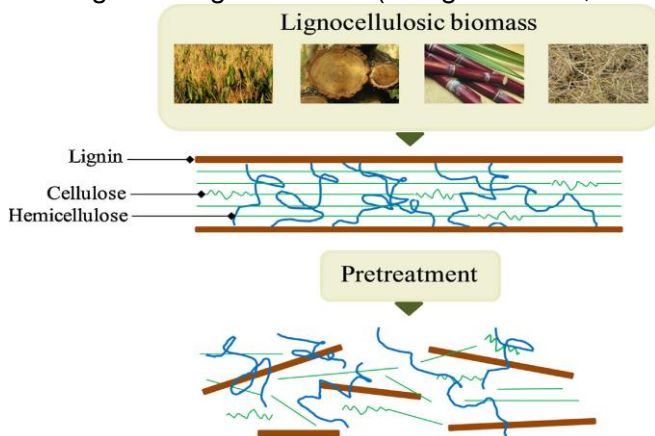
Gambar 2.6 Struktur Vanillin dan Isovanilin (Egawa *et al.*, 2006)

Menurut Beedham (2005) meskipun vanillin dan isovanilin memiliki struktur aldehyd fenolik yang sama tapi memiliki letak struktur yang berbeda, pada faktanya kedua isomer ini memiliki jalur metabolisme yang bervariasi dimana

vanillin dime-tabolisme oleh aldehyd dehidrogenase. Menurut Egawa (2006) isovanillin berbeda dari vanillin, dipol listrik dari kelompok vanili dan aldehyda isovanillin terletak pada ikatan C7 = O8 dengan muatan positif pada posisi atom C7. Di sisi lain, dipol listrik dari atom vanillin memiliki magnitudo yang sebanding dan terletak kira-kira pada ikatan C3-C4 dengan posisi positif pada posisi atom C3. Vanillin (4-hidroksi-3-metoksi benzaldehida), isovanillin (3-hidroksi-4-metoksibenzaldehida).

2.5 Pretreatment Lignoselulosa Secara Biologi

Pretreatment bertujuan untuk mengurangi kristalinitas, dapat meningkatkan luas permukaan biomassa, menghapus hemiselulosa, membuka struktur lignin. *Pretreatment* membuat senyawa lignoselulosa lebih mudah diakses sehingga konversi polimer didapatkan lebih cepat dengan hasil yang maksimal (Mosier *et al.*, 2005). *Pretreatment* biologi menggunakan mikro-organisme umumnya mikro yang digunakan adalah jamur pelapuk coklat, jamur pelapuk putih dan *soft-rot fungi* yang mendegradasi lignin dan hemiselulosa serta selulosa (Sanchez, 2009). *Pretreatment* secara kimia memiliki kelemahan diantaranya peralatan yang digunakan harus tahan korosi dan pembuangan limbah kimianya dirancang secara khusus. *Pretreatment* biologi, metode yang aman dan ramah lingkungan untuk degradasi lignoselulosa (Taniguchi *et al.*, 2005).



Gambar 2.7 Pretreatment Lignoselulosa (Laurichese *et al.*, 2013)

Lignoselulosa dapat diklasifikasikan dalam empat kelompok berdasarkan jenis sumber daya yaitu residu hutan, limbah padat, limbah kertas, dan sumber sisa tanaman (Balat, 2011). Kompleksitas struktural hemiselulosa (c-5 dan c-6 gula kompleks), lignin, struktur kristal selulosa (polimer β -1,4-glukosa) dan pektin membuat lignoselulosa sangat larut dalam beberapa pelarut organik (Hamelinck *et al.*, 2005). Setiap *pretreatment* memiliki efek tersendiri pada selulosa, hemiselulosa dan lignin (Aloisio *et al.*, 2014). Pengaruh *pretreatment* dapat dilihat pada **Gambar 2.7**.

2.6 *Serpula lacrymans*

Jamur pelapuk coklat termasuk dalam kelompok taksonomi yang sama dengan jamur pelapuk putih. Jamur pelapuk coklat seperti *S. lacrymans* selektif dalam menguraikan selulosa dan hemiselulosa bagian lignoselulosa, serta dapat memodifikasi struktur lignin. Suhu pertumbuhan optimal *Serpula lacrymans* adalah 20°C-22°C tetapi pada suhu 26°C-27°C masih dapat tumbuh meskipun tidak optimal (Watkinson, 2012). Degradasi lignoselulosa oleh *Serpula lacrymans* dimulai dengan enzim *oxidoreduktase* yang menghasilkan H₂O₂ (hidrogen peroksida) sebagai material untuk reaksi Fenton sedangkan material lain seperti zat besi bisa ditemukan dilumen sel kayu atau terikat komponen kayu di dinding sel. Kemudian zat besi yang direduksi akan bereaksi dengan H₂O₂ membentuk hidroksil radikal (Goodell, 2003). Reaksi Fenton dapat dilihat sebagai berikut (Watkinson, 2012):



Selama pertumbuhan, jamur pelapuk coklat dapat menurunkan pH. Penurunan pH dikarenakan adanya produksi asam organik, asam oksalat yang paling banyak diproduksi oleh jamur pelapuk coklat dalam jumlah besar (Jellison *et al.*, 2007). Dibandingkan dengan jamur pelapuk putih, jamur pelapuk coklat memiliki mekanisme yang berbeda untuk degradasi polisakarida dinding sel tanaman. Jamur pelapuk coklat seperti *Serpula lacrymans* adalah degrader kayu yang efisien. Jamur coklat melakukan mekanisme pembusukan didorong melalui modifikasi

struktur lignin, memanfaatkan hemiselulosa dan selulosa dengan meninggalkan modifikasi lignin, memberikan warna coklat pada pembusukan kayu (Green dan Highley, 2007) dimana pada proses tersebut akan dihasilkan residu fenolik lignin yang memiliki nilai potensial sebagai bahan baku untuk industri kimia` (Watkinson, 2012). Jamur pelapuk coklat mengalami reaksi Fenton, menghasilkan hidroksil radikal secara non enzimatis (Arantes *et al.*, 2009).

2.7 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya. Kelarutan merupakan kuantitas maksimal suatu zat kimia terlarut (solut) untuk larut pada pelarut tertentu membentuk larutan homogen. Kelarutan suatu zat dasarnya sangat bergantung pada sifat fisika dan kimia solut dan pelarut (Nisa, 2014). Prinsip dasar ekstraksi melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non-polar dalam pelarut non-polar (Wahyuni, 2015). Ekstraksi dengan pelarut cair merupakan metode yang paling baik digunakan dalam memisahkan senyawa bioaktif dari alam. Secara umum hasil proses ekstraksi dan komponen-komponen yang terekstrak sangat tergantung pada sifat bahan dan sifat pelarutnya (Mukhrani, 2012).

Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu (Sarker, 2006). Diantara berbagai jenis metode pemisahan, ekstraksi pelarut merupakan metode pemisahan yang paling baik dan populer. Alasan utamanya adalah bahwa pemisahan ini dapat dilakukan baik dalam tingkat makro ataupun mikro. Prinsip metode ini didasarkan distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara senyawa dan pelarut yang tidak saling bercampur. Teknik ini dapat dipergunakan untuk pemurnian, pemisahan serta analisis (Suyitno, 2008).

Proses ekstraksi terbagi menjadi dua jenis yaitu ekstraksi mekanis dan ekstraksi pelarut. Ekstraksi mekanis menggunakan penekanan atau pengempaan sedangkan ekstraksi pelarut didasarkan pada sifat kelarutan (Suyitno, 2008). Pemilihan jenis pelarut adalah salah satu faktor yang mempengaruhi proses

ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan. Terdapat beberapa jenis pelarut antara lain pelarut polar, semi polar dan non polar (Sarker, 2006). Pada proses ekstraksi, terjadi perpindahan massa (*solute*) dari padatan ke pelarut (Marnoto, 2012). Suatu proses pemisahan dimana komponen mengalami perpindahan massa dari suatu padatan ke cairan atau dari cairan ke cairan lain yang bertindak sebagai pelarut. Berbagai penelitian tentang ekstraksi padat-cair telah banyak dilakukan. Ekstraksi padat cair, yang sering disebut *leaching*, adalah proses pemisahan zat yang dapat melarut (*solute*) dari suatu campurannya dengan padatan yang tidak dapat larut (*innert*) dengan menggunakan pelarut cair (Santosa, 2014).

2.7.1 Volume Pelarut Etanol dan Lama Waktu Ekstraksi

Volume pelarut tertentu dapat mempengaruhi dinding sel, permeabilitas jaringan dinding sel meningkat sehingga perpindahan masa ke pelarut lebih cepat. Selain itu volume pelarut juga meningkatkan luas kontak permukaan antara fase padat dan fase cair pada saat ekstraksi (Dong *et al.*, 2014). Lama ekstraksi dengan waktu tertentu akan menyebabkan celah-celah bahan mengembang di dalam sel. Secara signifikan transfer massa dari bahan ke pelarut lebih banyak karena waktu kontak antara bahan dan pelarut lebih lama (Rasomandary *et al.*, 2013). Semakin lama waktu ekstraksi, kuantitas bahan yang terekstrak semakin meningkat dikarenakan kesempatan untuk bersentuhan antara bahan dengan pelarut makin besar sehingga hasilnya akan bertambah sampai titik jenuh larutan (Mandal, 2007).

Pelarut adalah suatu jenis bahan yang ditambahkan untuk membentuk suatu fase yang berbeda dari bahan yang ingin dipisahkan. Pelarut menyebabkan pori-pori bahan mengembang sehingga zat yang berada di dalam bahan berdifusi keluar permukaan partikel bahan (Dwiari, 2008). Pelarut yang baik untuk ekstraksi yaitu pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi (Houngton, 2009). Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 2009). Pelarut etanol sering digunakan

sebagai pelarut dalam laboratorium karena bersifat *inert* sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Etanol memiliki titik didih yang rendah sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya (Mukhriani, 2012). Pemilihan pelarut umumnya dipengaruhi beberapa faktor seperti mudah tidaknya pelarut dapat melarutkan semua zat yang akan diekstrak dengan cepat dan sempurna (selektivitas), titik didih pelarut, titik didih cukup rendah sehingga pelarut mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang terlalu tinggi, pelarut bersifat *inert* sehingga tidak bereaksi dengan komponen lain, dan harga pelarut semurah mungkin (Guenther, 2007).

2.7.2 Polaritas

Kelarutan zat dalam pelarut dipengaruhi oleh tingkat kepolaran pelarutnya. Zat yang polar akan larut dalam pelarut polar sedangkan zat non polar akan larut dalam pelarut non polar (Dwiari, 2008). Berdasarkan sifat kepolarannya, suatu bahan digolongkan menjadi polar dan non polar. Suatu bahan bersifat polar apabila molekulnya mengandung ikatan ganda, gugus karbonil dan atom elektronegatif sedangkan bahan non polar molekulnya tidak mengandung ikatan ganda, gugus karbonil dan atom elektronegatif (Houngton dan Raman, 2009). Tingkat polaritas pelarut dapat dilihat pada **Tabel 2.2**. Gugus aldehida (-CHO) pada senyawa vanillin cenderung bersifat polar (Purwono, 2007). Jenis dan tingkat kepolaran suatu pelarut menentukan jenis dan jumlah senyawa yang dapat diekstrak. Pelarut akan mengekstrak senyawa yang mempunyai kepolaran yang sama atau mirip dengan kepolaran pelarut yang digunakan (Pendit, 2016). Etanol merupakan pelarut organik yang cenderung polar (Marnoto, 2012).

Pelarut dapat melarutkan ekstrak yang mempunyai sifat kepolaran yang sama (Arastani, 2002). Pemilihan jenis pelarut untuk ekstraksi harus tepat agar dapat memperoleh senyawa yang dikehendaki (Sari, 2011). Aseton, metanol dan etanol merupakan senyawa pelarut polar (Marnoto, 2012). Pelarut etanol merupakan pelarut polar yang bersifat universal dengan indeks polaritas 5,2 (Poeloengan, 2007). Setiap jenis pelarut memiliki index kepolaran yang berbeda, senyawa polar memiliki

kemampuan mengekstrak senyawa dari kisaran senyawa polar hingga semi polar (Sari, 2011).

Tabel 2.2 Indeks Polaritas Pelarut Organik

Pelarut	Indeks Polaritas Pelarut	Titik Didih (°C)
n-heksana	0,1	69
Diklorometana	3,1	41
n-butanol	3,9	118
Iso-propanol	3,9	82
n-propanol	4,0	92
kloroform	4,1	61
Etil asetat	4,4	77
Aseton	5,4	56
Etanol	5,2	65
Metanol	5,6	78
Air	9,0	100

Sumber : Sarker, Latif dan Gray (2006).

2.8 Evaporasi

Evaporasi merupakan suatu proses penguapan sebagian dari pelarut sehingga didapatkan larutan zat cair pekat yang konsentrasinya lebih tinggi (Senjaya dan Surakusumah, 2008). *Vaccum Rotary Evaporator* adalah alat yang berfungsi untuk memisahkan suatu larutan dari pelarutnya sehingga dihasilkan ekstrak kimia tertentu sesuai yang diinginkan (Pranoto, 2012). Prinsip evaporasi pada dasarnya yaitu menguapkan sebagian atau keseluruhan pelarut sehingga yang tersisa hanya larutan yang pekat atau kental serta memiliki konsentrasi yang tinggi. Tujuan dari evaporasi adalah untuk memekatkan larutan yang terdiri dari komponen zat yang memiliki titik didih rendah (mudah menguap) dengan zat yang memiliki titik didih yang tinggi (tidak mudah menguap), proses evaporasi kebanyakan pelarutnya adalah air. Zat yang dimaksud atau yang diuapkan agar terlepas dari larutan yang diinginkan dari sampel (Ariyani, 2008).

Zat yang ingin diuapkan biasanya ditempatkan dalam suatu labu yang kemudian dipanaskan dengan bantuan penangas, dan diputar. Uap cairan yang dihasilkan didinginkan oleh suatu pendingin (kondensor) dan ditampung pada suatu tempat (*receiver flask*). Perbedaan evaporasi dan destilasi yaitu, uap

yang dihasilkan pada evaporasi biasanya komponen tunggal. Walaupun uap masih berupa campuran, biasanya dalam proses evaporasi ini tidak ada usaha untuk memisahkannya menjadi fraksi-fraksi sedangkan pada destilasi, uap yang dihasilkan masih memiliki komponen lebih dari satu (Pranoto, 2012). Hasil proses ekstraksi lignoselulosa menggunakan pelarut air dan etanol menghasilkan campuran larutan fenolik dan etanol sehingga perlu dilakukan pemisahan antara etanol dan senyawa fenolik khususnya senyawa vanilin. Pemisahan antara larutan etanol dan senyawa fenolik seperti vanilin dapat dilakukan dengan evaporator (Ariyani, 2008).

2.9 Response Surface Method

Tujuan *response surface method* (RSM) adalah untuk mengoptimalkan respon (variabel output) yang dipengaruhi oleh beberapa variabel independen (variabel input). Eksperimen adalah serangkaian tes perubahan yang dibuat dalam variabel input untuk mengidentifikasi alasan yang mempengaruhi perubahan respon output (Boyaci, 2007). Secara umum, RSM terdiri dari tiga tahap, desain eksperimen, model permukaan respon dan optimasi (Seifollahi *et al*, 2017).

Response surface method (RSM) terdiri dari kelompok matematika dan teknik statistik yang digunakan dalam pengembangan yang mengarahkan pada hubungan fungsional antara respon y dan sejumlah kontrol terkait atau *input* variabel dilambangkan dengan x_1, x_2, \dots, x_k . Secara umum, hubungan tidak diketahui tetapi dapat dikitkani dengan derajat Model polinomial dari bentuk $y = f(x)\beta + (1)$ dimana $x = (x_1, x_2, \dots, x_k)$. $F(x)$ adalah fungsi vektor elemen p yang terdiri x_1, x_2, \dots, x_k sampai tingkat tertentu dinotasikan dengan $d (\geq 1)$, β adalah vektor p tidak diketahui koefisien konstan disebut sebagai parameter (Amran *et al.*, 2014). RSM selama ini digunakan untuk pengembangan dan optimasi proses dalam respon utama yang diakibatkan oleh beberapa variable dan tujuannya adalah optimasi respon tersebut (Boyaci, 2007).

2.10 Penelitian Terdahulu

Pada penelitian Dong *et al.*, (2014), melakukan penelitian perbandingan empat macam teknik ekstraksi vanili dari *Vanilla*

planifolia. Pada salah satu metode ekstraksinya menggunakan metode maserasi yaitu proses perendaman sampel dengan menggunakan pelarut etanol disertai pengocokan atau pengadukan pada suhu tertentu. Proses maserasi dilakukan dalam *shaking water bath* pada suhu 25°C selama waktu yang bervariasi hingga 720 menit menggunakan pelarut etanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama waktu ekstraksi semakin tinggi kadar vanillin yang diperoleh. Pada penelitian Dey (2014) volume pelarut pada perbandingan tertentu dapat melarutkan TPC (*Total phenolic compound*) secara maksimal pada gandum. Senyawa *phenolic* yang dihasilkan terdiri dari asam ferulat, vanillin dan senyawa aromatik lainnya. Ekstraksi menggunakan pelarut etanol dengan volume bahan banding pelarut (1:0,5 s/d 1:2 w/v). Pada jurnal tersebut *total phenolic compound* mengalami kenaikan signifikan saat volume bahan banding pelarut pada volume 1:1 s/d 1:2 (w/v) dan terus mengalami kenaikan seiring bertambahnya pelarut etanol.

Pada penelitian Shakeel *et al.*, (2015) meneliti kelarutan vanilin pada sepuluh jenis pelarut yang berbeda. Pelarut yang digunakan antara lain air, etanol, etilen, glikol, etil asetat, isopropanol, propilen glikol, polietilen glikol, transcutol, butanol-1 dan butanol-2, dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa vanilin larut dalam pelarut etanol. Selanjutnya Matin (2017) melakukan proses ekstraksi senyawa fenolik dari buah delima Iran (*Punica granatum*). Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol dengan lama ekstraksi yang bervariasi. Lama waktu yang diekstraksi yang digunakan yaitu 2, 4 dan 6 jam.

2.11 Hipotesa

Diduga titik optimal dari ekstraksi senyawa yang diduga vanilin hasil biodegradasi pod kakao dapat diperoleh dari interaksi faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri Fakultas Teknologi Pertanian (FTP) Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 2 Januari 2017 sampai selesai.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Timbangan digital, oven, timbangan analitik, desikator, *Erlenmeyer*, *petridish disposable*, *laminar air flow*, gelas ukur, *waterbath* (Julabo SW 22), pH-meter, spektrometer (*Thermo Scientific Genesys 10 UV*), *autoclave* (Hirayama HVE-50), tip mikro, mikro pipet 0,1-1 mL, oven, piknometer 10ml dan evaporator (IKA RV 10), corong, kain saring, kertas saring, baskom, panci, spatula, sarung tangan, parafilm, masker, inoelop, bunsen, termometer, botol kaca diameter 8 cm, gelas *beaker*, *tissue*, *aluminium foil*, plastik, *centrifuge tube*, pinset, tip mikro, kompor, saringan besi, gunting, tempat tabung reaksi dari aluminium, kuvet.

3.2.2 Bahan

Pod kakao jenis *cricollo* dari Desa Plosorejo, RT. 01 / 06, Plosorejo Kademangan Blitar Jawa Timur, etanol pa, *malt extract agar*, barley, 3,5 DNS (*Dinitrosalysilic acid*), *gypsum* CaSO_4 , CaCO_3 , NaOH, alkohol 70%, spirtus, isolat jamur *Serpula lacrymans*, aquades, glukosa, agar, *yeast extract*, aquades, Na_2CO_3 , alumunium foil.

3.3 Rancangan Penelitian

Pengamatan dilakukan selama 35 hari dan dilakukan uji *Total Soluble Phenol* (TSP) setiap 7 hari sebanyak 1 sampel dengan 2 kali ulangan. Metode analisis yang digunakan menggunakan regresi. Metode analisis tersebut digunakan untuk mengetahui nilai TSP tertinggi sebagai indikasi lignin sudah terdegradasi sempurna. Kemudian data TSP tertinggi digunakan sebagai parameter pengamatan inkubasi untuk menguji kadar vanillin dan fenol terlarut etanol menggunakan spektrofotometri. Penelitian dan pengamatan selanjutnya

dilakukan pada minggu ke-TSP tertinggi. Rancangan percobaan yang dilakukan pada tahap ini menggunakan *Response Surface Methode*.

Optimasi dilakukan pada dua faktor yaitu volume pelarut etanol dan lama ekstraksi dengan menggunakan *Response Surface Method* supaya dihasilkan kondisi optimal dalam menghasilkan vanillin yang diperoleh dari pod kakao. Faktor perlakuan yang akan dilakukan yaitu volume pelarut etanol X_1 (ml) dan lama ekstraksi X_2 (menit) sebagai variabel bebas (**Tabel 3.1**). Variabel respon terdiri dari kadar vanillin dan fenol larut etanol. Rancangan penelitian menggunakan *response surface method* dapat dilihat pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.1 Tarif Level Faktor

Faktor	-1	0	1
Pelarut Etanol (ml)	20	40	60
Lama Waktu Ekstraksi (menit)	120	240	480

Berdasarkan Tabel 3.1 dapat diketahui jarak antara level yaitu:

- ✓ Jarak antar level faktor volume pelarut etanol=40-20=20 ml
- ✓ Jarak antar level faktor lama waktu ekstraksi =240-120=120 menit

Menetapkan level-level faktor yang sesuai dengan titik pusat $X_1=0$ dan $X_2=0$. Faktor volume pelarut etanol, hubungan antara variable X_1 dengan variable asli dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$X_1 = \frac{A-(40)}{20}, A = 20X_1 + 40 \dots\dots\dots (I)$$

Faktor lama ekstraksi, hubungan variable-variabel X_2 dengan variable asli dapat diketahui dengan cara yang sama sehingga dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$X_2 = \frac{B-240}{120}, B = 120X_2 + 240 \dots\dots\dots (II)$$

Menentukan nilai $\alpha=2$ karena penelitian ini menggunakan dua faktor maka nilai $k=2$, sehingga $\alpha=2 = 1,414$. Setelah itu menentukan level-level faktor yang sesuai dengan nilai $-\alpha=-1,414$ dan $\alpha=1,414$ perhitungan melalui hubungan variable X_1 dan X_2 dengan variable asli dalam persamaan (i) dan (ii).

Dari persamaan (i) diketahui bahwa:

- ✓ $X_1 = -1,414$ sehingga $A = 20(-1,414) + 40 = 11,72$ ml
- ✓ $X_1 = 1,414$ sehingga $B = 20(1,414) + 40 = 68,28$ ml

Dari persamaan (ii) diketahui bahwa:

- ✓ $X_2 = -1,414$ sehingga $A = 120(-1,414) + 240 = 70,32$ menit
- ✓ $X_2 = 1,414$ sehingga $B = 120(1,414) + 240 = 409,68$ menit

Tabel 3.2. Rancangan Percobaan Ekstraksi Vanilin Berdasarkan RSM

Variabel Kode		Variabel Asli		Respon	
X_1 (Volume Pelarut Etanol)	X_2 (Lama Ekstraksi)	Volume Pelarut Etanol (ml)	Lama Ekstraksi (menit)	Kadar Vanillin (%)	Fenol Larut Etanol ($\mu\text{g/g}$)
-1	-1	20	120	Y_1	Y_2
1	-1	60	120	Y_1	Y_2
-1	1	20	360	Y_1	Y_2
1	1	60	360	Y_1	Y_2
-1,414	0	11,72	240	Y_1	Y_2
1,414	0	68,28	240	Y_1	Y_2
0	-1,414	40	70,32	Y_1	Y_2
0	1,414	40	409,68	Y_1	Y_2
0	0	40	240	Y_1	Y_2
0	0	40	240	Y_1	Y_2
0	0	40	240	Y_1	Y_2
0	0	40	240	Y_1	Y_2
0	0	40	240	Y_1	Y_2
0	0	40	240	Y_1	Y_2

Berdasarkan pada rancangan percobaan yang diperoleh, maka didapatkan titik komposit terpusat pada **Tabel 3.3**.

Tabel 3.3 Titik Komposit Terpusat yang Dicobakan

faktor	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Volume Pelarut E(ml)	11,72	20	40	60	68,28
Lama Ekstraksi (menit)	70,32	120	240	360	409,68

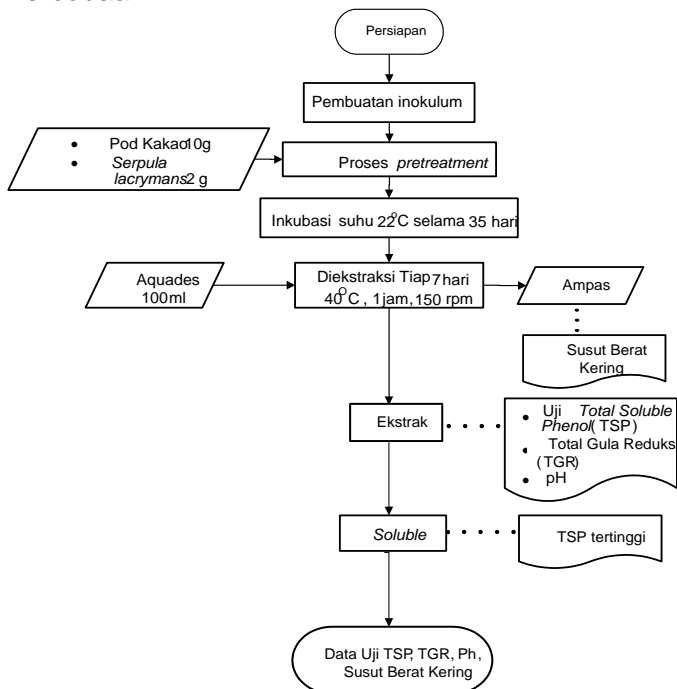
3.4 Batasan Masalah

1. Penelitian skala laboratorium
2. Pengaturan suhu ruangan dan inkubasi $22 \pm 2^\circ\text{C}$
3. Inokulan *grain spawn* $2 \pm 0,2$ gram
4. Hanya menggunakan jamur *Serpula lacrymans*

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan beberapa tahapan, dimulai dengan persiapan bahan, inokulasi, inkubasi, ekstraksi, uji *total soluble phenol* hingga uji kadar vanillin secara detailnya tahapan tersebut ditunjukkan pada **Gambar 3.1a** dan **Gambar 3.1b**.

a. Percobaan I

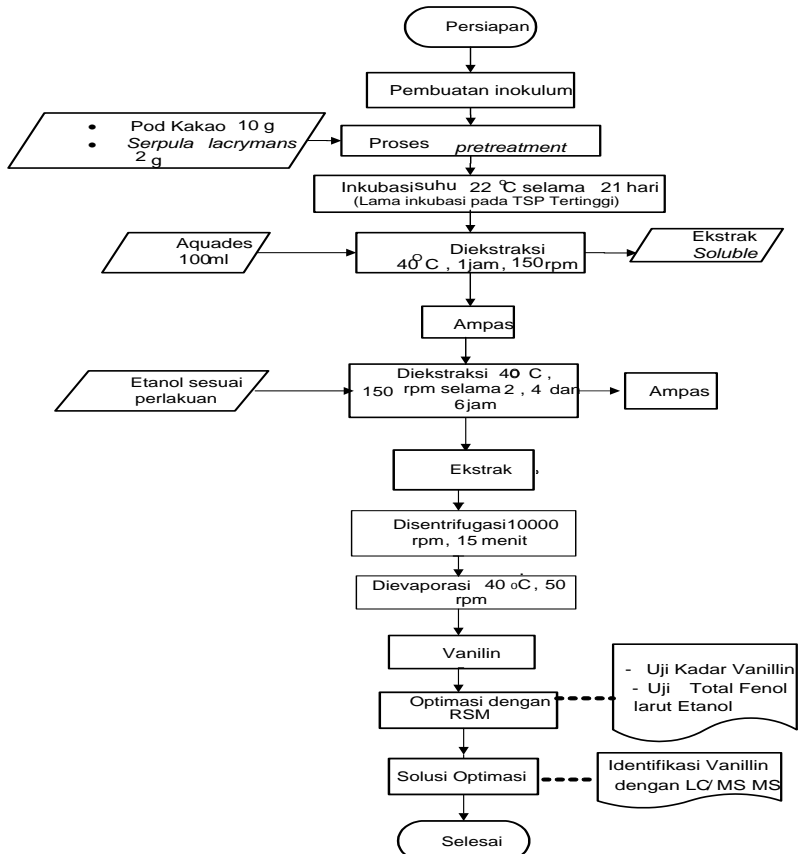


Gambar 3.1a Diagram Alir Tahap Penelitian Percobaan I

b. Percobaan II

Hasil Uji dengan lama inkubasi TSP tertinggi digunakan sebagai parameter pengamatan lama inkubasi selanjutnya untuk menguji persentase kadar vanillin yang diduga masih

terdapat pada ampas. Pada percobaan II dilakukan dua kali proses ekstraksi. Ekstraksi pertama menggunakan pelarut aquades, ekstraksi kedua menggunakan pelarut etanol.



Gambar 3.1b Tahapan Penelitian Percobaan II

3.5.1 Preparasi Bahan dan Mikroorganisme

Pada tahap preparasi bahan dan mikroorganisme dimulai dengan penyediaan dan pemotongan pod kakao yang sudah dikeringkan, pembuatan media MEA (*Malt Ekstrak Agar*) dan barley untuk memperbanyak isolate jamur *Serpula lacrymans*. Pod kakao basah dijemur selama 14 hari agar kering kemudian dipotong 1-2 cm. Perbanyak *Serpula lacrymans* ditempatkan

pada cawan petri *disposhable* yang berisi media MEA telah disterilkan dengan *autoclave*. Inokulasi dilakukan di *laminar air flow* dengan kondisi steril. Kemudian diinkubasi pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dan dilakukan pengamatan dari hari ke-3 sampai semua permukaan media dipenuhi oleh koloni jamur. Kultur pada MEA juga diperbanyak pada botol kaca yang berisi barley yang telah dimasak dan telah disterilkan dengan autoklaf. Penumbuhan kultur barley bertujuan untuk memudahkan dalam penimbangan berat inokulum yang ditambahkan pada bahan pod kakao. Kultur pada barley ini diamati pertumbuhannya dari hari ke-6 sampai seluruh barley dipenuhi oleh jamur *Serpula lacrymans*.

A. Pembuatan Media Malt Ekstrak Agar

Pembuatan media Malt Ekstrak Agar (MEA) dimulai dengan penimbangan Malt ekstrak dan Agar masing-masing ditimbang sebesar 20 gram dan 12 gram. Malt ekstrak dan agar dicampurkan ke dalam 1 L aquades di dalam erlenmeyer. Diaduk hingga malt ekstrak dan agar tercampur menggunakan spatula. Kemudian erlenmeyer ditutup menggunakan kapas, kertas coklat dan dibungkus menggunakan kantong plastik untuk menghalangi uap air masuk. Diautoclaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Didiamkan hingga suhu $\pm 40\text{-}50^{\circ}\text{C}$. Malt ekstrak agar yang telah hangat dituangkan ke dalam cawan petri sampai setengahnya pada *laminar air flow*. Kemudian didiamkan hingga padat. Ditutup kemudian dirapatkan menggunakan parafilm agar tidak mudah lepas. MEA yang telah padat dan dingin dapat digunakan sebagai media peumbuhan jamur. *Flow chart* pembuatan media MEA dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

B. Inokulasi Pada Media MEA

Pada proses pemindahan jamur pada MEA harus steril agar terhindar dari kontaminasi. Sebelum dilakukan proses inokulasi, *Laminar Air Flow* (LAF) disterilkan terlebih dahulu. Kemudian disiapkan media MEA yang telah padat dan isolat *Serpula lacrymans*. Inokulasi dilakukan dengan memindahkan isolat *Serpula lacrymans* satu ose pada media MEA yang telah padat. Dalam hal ini digunakan inoloop untuk memindahkan isolat jamur tersebut. Kemudian ditutup, dirapatkan kembali dengan

parafilm. Kemudian diinkubasi pada suhu $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Selama inkubasi diamati pertumbuhannya, jika terkontaminasi maka dilakukan pengulangan inokulasi.

C. Pembuatan Media *Grain Spawn*

Cara pembuatannya seperti memasak nasi atau kacang hijau. Hanya ditambahkan dengan air dan dipanaskan dengan api kecil, dalam waktu singkat tekstur barley menjadi lunak. Ketika barley lunak, teksturnya agak lengket seperti nasi. Hal ini disebabkan oleh kandungan karbohidrat dan pati yang cukup tinggi. Proses pembuatan barley ini hampir sama dengan nasi, namun pada pembuatan barley ini tidak sampai lunak. Diagram alir pembuatan *grain spawn* dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

Tahapan pembuatan media barley dimulai dengan 1 kg barley dicuci dengan air mengalir sebanyak 2 kali. Kemudian barley dipindahkan ke dalam panci dan ditambahkan aquades sebanyak 1 liter. Barley dimasak dengan api kecil sambil sesekali diaduk selama $\pm 7-10$ menit. Setelah barley sedikit lunak, kemudian ditiriskan atau disaring untuk memisahkan air yang masih ada. Barley yang telah masak dipindahkan ke dalam baskom dan ditambahkan CaSO_4 10 mg dan CaCO_3 3 mg. Barley didiamkan sampai suhu $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$. Kemudian dipindahkan ke dalam botol kaca dengan berat seragam (satu botol berisi ± 100 gram). Botol yang diisi dengan barley ditutup kemudian diautoclaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Setelah diautoclaf, didiamkan semalam atau ± 24 jam untuk menghindari kontaminasi. Diautoclaf kembali pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Setelah diautoclaf didiamkan sampai suhu $\pm 40-50^{\circ}\text{C}$ dan barley siap diinokulasi.

D. Inokulasi pada *Grain Spawn*

Penanaman jamur pada barley untuk mempermudah dalam penimbangan inokulum sehingga diketahui berapa berat kultur yang diinokulasikan ke dalam bahan. Inokulasi dilakukan dengan memindahkan isolat *Serpula lacrymans* 3 sampai 4 ose pada media Barley. Digunakan inoloop untuk memindahkan isolat jamur tersebut. Kemudian ditutup dan dirapatkan kembali dengan parafilm. Kemudian diinkubasi pada suhu $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Selama inkubasi diamati pertumbuhannya, jika terkontaminasi maka dilakukan pengulangan inokulasi (**Lampiran 4**).

3.5.2 Pretreatment Pod Kakao

Sebelum pod kakao diinokulasi, ada beberapa perlakuan atau *treatment* pada pod kakao untuk mempermudah hidrolisis. Pod kakao sebanyak 1,3 kg tersebut dipotong 1-2 cm. Setiap botol diisi dengan pod kakao 10 gram. Kemudian ditambah aquades 10 ml. Setelah itu diautoclaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Untuk menghindari kontaminasi, didiamkan satu malam ± 24 jam. Diautoclaf kembali pada suhu, tekanan dan lama yang sama dengan sebelum didiamkan. Didinginkan sampai suhu sekitar 40-50°C. Kemudian *Serpula lacrymans* yang tumbuh pada barley sebanyak 2 ± 0.2 gram diinokulasi ke masing-masing botol. Diinkubasi selama 35 hari pada suhu $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Kemudian diamati pada hari ke 35 dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan sampel, ekstraksi dilakukan dengan menggunakan air terlebih dahulu kemudian filtratnya ditambah pelarut etanol dengan perbandingan yang terdapat pada RSM. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH, susut berat, TSP (*Total Soluble Phenol*) dan konsentrasi vanilin.

3.5.3 Pengujian Total Gula Reduksi (TGR) (Miller, 1959)

Berikut langkah-langkah pengujian total gula reduksi:

- 1) Dibuat larutan glukosa, larutan DNS, larutan campuran DNS dengan glukosa dan larutan campuran DNS dengan aquades.
- 2) Larutan stok glukosa dibuat dengan konsentrasi 1 mg/ml.
- 3) Larutan DNS dibuat dari 250 ml potasium sodium tartate (400mg/ml), 50 ml DNS (100mg/ml) dan 50 ml sodium hidroksida (200mg/ml) dan dilarutkan menjadi satu. Aquades ditambahkan hingga 500ml.
- 4) Larutan campuran DNS dengan glukosa, dilarutkan 1,8 ml larutan DNS dengan 1.8 ml glukosa (konsentrasi 1 mg/ml) pada tabung reaksi.
- 5) Larutan campuran DNS dengan aquades, dilarutkan 1,8 ml larutan DNS dengan 1,8 ml aquades (**Lampiran 12**).
- 6) Dibuat larutan standar gula reduksi. Konsentrasi standar glukosa disiapkan.

yaitu sebesar 0.0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml dan 1 mg/ml.

- 7) Larutan standar dibuat pada 6 tabung reaksi, dimasukkan larutan campuran DNS dan aquades masing-masing 500µl, 400µl, 300µl, 200µl, 100µl, dan 0µl.
- 8) Ditambahkan larutan campuran DNS dan glukosa masing-masing sebesar 0µl, 100µl, 200µl, 300µl, 400µl, dan 500µl.
- 9) Ditambahkan DNS 500µl padamasing-masing tabung reaksi.
- 10) Tabung reaksi dididihkan selama 15 menit pada *waterbath* dengan ditutup menggunakan alumuniun foil.
- 11) Larutan diukur pada panjang gelombang 540 nm.
- 12) Absorbansi yang tertera pada Spektrofotometer dicatat kemudian dibuat kurva dengan sumbu x (konstentrasi) dan sumbu y (absorbansi) sehingga dihasilkan persamaan ($y = mx+c$) (**Lampiran 13**). Berikut persamaan yang dihasilkan pada kurva larutan standar glukosa:

$$y = mx + c$$

Keterangan :

y = absorbansi

m = gradient

x = gula reduksi (mg/ml)

c = konstanta

- 13) Pengukuran gula reduksi pada hasil ekstrak pod kakao yaitu, 750µl DNS ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang sebelumnya telah dimasukkan 250 µl sampel.
- 14) Tabung reaksi dididihkan 15 menit pada *waterbath* dengan ditutup menggunakan alumuniun foil.
- 15) Diukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.
- 16) Absoransi disubtitusikan ke dalam rumus (y) sehingga kadar gula reduksi (x) dapat diketahui (**Lampiran 14**).

3.5.4 Ekstraksi Menggunakan Aquades (Modifikasi Nurika, 2013)

Hasil inkubasi selama 35 hari dilakukan uji *Total Soluble Phenol* (TSP) setiap 7 hari sebanyak 1 sampel dengan 2 kali ulangan. Hasil ekstrak menggunakan aquades diambil dari sampel bahan pod kakao dengan cara menambahkan 100 ml aquades yang dipanaskan hingga suhu 80°C pada botol untuk membantu melarutkan senyawa di dalam bahan. Kemudian

dishaker menggunakan *water bath* pada suhu 40°C, 150 rpm selama 1 jam. Setelah itu disaring menggunakan kain saring dan dilanjutkan dengan peyaringan menggunakan kertas saring. Hasil ekstrak disimpan pada *centrifuge tube* 50 ml untuk diuji TSP. Kemudian data TSP yang memiliki nilai tertinggi akan digunakan sebagai parameter pengamatan inkubasi selanjutnya untuk menguji kadar vanillin menggunakan volume pelarut etanol 20, 40 dan 60 ml serta lama waktu ekstraksi 2, 4 dan 6 jam (**Lampiran 5**).

3.5.5 Pengujian Ekstrak dari Pod Kakao (Pelarut Aquades)

A. Pengujian *Total Soluble Phenols* (Singleton and Rossi, 1965)

Pada prinsipnya senyawa fenol bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu (larutan FC) akan memberi warna kuning dan dengan penambahan alkali akan menghasilkan warna biru dan diukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm. Kandungan fenol total dalam bahan dibandingkan terhadap standar asam galat. Asam galat digunakan sebagai standar pengukuran dikarenakan asam galat merupakan senyawa polifenol yang terdapat di hampir semua tanaman. Kandungan fenol asam organik ini bersifat murni dan stabil.

Berikut langkah-langkah pengujian total *soluble phenol*:

- 1) Larutan asam galat dibuat, yakni sebanyak 500µg asam galat dihomogenkan dengan etanol 96% 10ml. Ditambahkan aquades hingga 100ml, sehingga diperoleh asam galat konsentrasi 5µg/ml (**Lampiran 6**).
- 2) Larutan Na₂CO₃ dibuat, yakni sebanyak 200g Na₂CO₃ dilarutkan dengan 800 ml aquades. Didihkan dan dilakukan inkubasi 24 jam, sehingga diperoleh larutan Na₂CO₃ konsentrasi 0,2 g/ml (**Lampiran 6**).
- 3) Diukur absorbansi larutan standar fenol dengan menyiapkan 6 tabung reaksi dan dimasukkan aquades yaitu 500µl, 400µl, 300µl, 200µl, 100µl, dan 0µl.
- 4) Ditambahkan asam galat 0µl, 100µl, 200µl, 300µl, 400µl, dan 500µl. Ditambahkan 100µl larutan *Folin-Ciocalteu* dan didiamkan 8 menit.
- 5) Ditambahkan 400µl larutan sodium karbonat (Na₂CO₃).

- 6) Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 765 nm.
- 7) Nilai absorbansi dimasukan dalam kurva standar sebagai sumbu y dan konsentrasi larutan standar sebagai sumbu x (**Lampiran 7**).
- 8) Pengukuran total fenol terlarut, yakni sampel sebanyak 50 μL dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi.
- 9) Ditambahkan 450 μL aquades.
- 10) Ditambahkan 100 μL reagen *Folin-Ciocalteu*.
- 11) Didiamkan selama 8 menit dan dihomogenkan dengan 400 μL larutan Na_2CO_3 .
- 12) Diukur nilai absorbansi menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Nilai absorbansi tersebut dimasukkan dalam persamaan sebagai y, kemudian dihitung nilai x untuk mendapatkan nilai total fenol terlarut dalam larutan sampel (**Lampiran 8**).

B. Pengukuran pH pada Ekstrak Sampel

pH meter yang digunakan untuk mengukur pH sebelumnya dikalibrasi menggunakan aquades. Kemudian alat digunakan dalam mengukur sampel dengan mencelupkannya 1/3 dari larutan ekstrak. Setiap pengukuran dari satu sampel ke sampel lainnya, adaptor dibersihkan dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu.

3.5.6 Ekstraksi Vanilin Ampas Pod Kakao Menggunakan Pelarut Etanol (Modifikasi Dey *et al.*, 2014), (Modifikasi Dong *et al.*, 2014)

Tujuan dari ekstraksi menggunakan pelarut etanol yaitu untuk mendapatkan senyawa aromatik vanillin yang diperoleh dari ampas pod kakao. Proses ekstraksi ampas pod kakao menggunakan etanol dilakukan karena diduga vanillin tidak banyak larut dalam aquades diduga disebabkan pelarut terlalu polar. Berikut langkah-langkah ekstraksi vanillin menggunakan pelarut etanol (**Lampiran 9**):

- 1) Sampel ampas pod kakao ditambah etanol sesuai perlakuan
- 2) Dishaker menggunakan *water bath* suhu 40°C, 150 rpm sesuai rancangan RSM (faktor lama waktu ekstraksi).

- 3) Disaring menggunakan kain saring dan dilanjutkan dengan peyaringan menggunakan kertas saring.
- 4) Hasil ekstrak selanjutnya dilakukan *sentrifuge* agar ampas mengendap. Setelah itu bagian supernatan dipisahkan dengan ampasnya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- 5) Kemudian *supernatant* selanjutnya dievaporasi pada suhu 40°C dengan kecepatan 50 rpm sehingga yang tersisa hanya larutan yang pekat atau kental serta memiliki konsentrasi yang tinggi. Kemudian hasil ekstrak disimpan pada *centrifuge tube* 50 ml untuk diuji kadar vanillin.

3.5.7 Pengukuran Kadar Vanilin dari Substrat Ampas Pod Kakao (Pelarut Etanol) (Modifikasi Rasoamandrary, 2013) (Eni Hayani dan Tijjah Fatimah, 2008).

Kandungan yang diduga vanillin dalam bahan diukur serapannya pada panjang gelombang 348 nm. Hasil yang diperoleh dikalibrasi menggunakan kurva standar vanillin murni dan hasil akhirnya disajikan dalam satuan persentase ppm. Berikut langkah-langkah pengujian vanillin:

- 1) Larutan standar vanillin dibuat, yakni sebanyak 0,05 gr vanillin murni dihomogenkan dengan 2,5 ml etanol dan ditambahkan larutan aquades sampai 50 ml, kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh larutan A.
- 2) Diambil 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l dan 250 μ l kemudian masing-masing ditambah aquades sampai 2,5 ml dan dihomogenkan.
- 3) Masing-masing diambil 250 μ l ditambah 50 μ l NaOH 0,1N, aquades sampai 2,5 ml dan dihomogenkan.
- 4) Diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 348 nm dan nilai absorbansi dimasukan dalam kurva standar sebagai sumbu y dan konsentrasi standar sebagai sumbu x (**Lampiran 10**).
- 5) Pengukuran kadar vanillin, yakni sampel sebanyak 50 μ L dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi kemudian ditambah aquades sampai 2,5 ml dan dihomogenkan.
- 6) Masing-masing diambil 250 μ l ditambah 50 μ l NaOH 0,1N, aquades sampai 2,5 ml dan dihomogenkan.

- 7) Diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 348 nm. Nilai absorbansi tersebut dimasukkan dalam persamaan sebagai y, kemudian dihitung nilai x untuk mendapatkan nilai vanilin dalam larutan sampel (**Lampiran 11**).

Rumus kadar vanilin dalam persentase bahan kering dinyatakan sebagai berikut : Persentase Kadar vanilin = $\frac{X \times Fp}{M \times 10} \times 100\%$

X = Konsentrasi larutan contoh (ppm) yang didapat dari kurva kalibrasi standar vanillin.

Fp = Faktor pengenceran

M = Berat sampel (mg)

3.5.8 Persentase Susut Berat Kering (Pitt and Hocking, 2009)

Ampas bahan hasil ekstraksi dioven dengan suhu 80°C selama sekitar 16-22 jam. Bobot bahan diukur hingga konstan. Penentuan kehilangan susut berat kering dapat dihitung dengan rumus berikut.

Penurunan bobot kering *pod kakao* padi hari ke-t (%):

$$\frac{BKO \text{ hari ke } 0 - BKO \text{ hari ke } t}{BKO \text{ hari ke } 0} \times 100\%$$

Keterangan :

BKO = Berat Kering Oven

3.6 Optimasi Persentase Penambahan Pelarut Etanol dan Lama Ekstraksi Vanillin Hasil Degradasi Pod Kakao

A. Optimasi dengan *Response Surface Method* (RSM)

Optimasi ekstraksi vanillin hasil degradasi lignoselulosa terhadap respon kadar vanillin dan fenol terlarut menggunakan pelarut etanol dilakukan menggunakan *Response Surface Method* (RSM). Optimasi dilakukan pada faktor penambahan pelarut etanol dan lama ekstraksi dengan rata-rata nilai TSP tertinggi. Data seluruh hasil pengujian dianalisis menggunakan *Software "Design Expert 7.0.0"*.

B. Identifikasi Vanillin dengan *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization tandem-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*. (Modifikasi Ong et al., 2007)

Identifikasi vanillin dilakukan pada sampel yang diinkubasi dengan jamur hasil perlakuan terbaik. Spesifikasi LC-ESI-MS/MS yang digunakan untuk pengujian adalah sebagai berikut:

- a) Mode injeksi partial loop dengan volume injeksi 3.000 μL
- b) Volume aliran (*flush*) 400 μL , kecepatan 100.000 $\mu\text{L/s}$
- c) Kecepatan penyemprotan 8.000 $\mu\text{L/s}$
- d) Waktu analisis yang digunakan ± 9 menit

Sampel diambil dengan menggunakan pipet sebanyak 200 μL kemudian ditambahkan 1 mL metanol HPLC *grade* dan 100 μL Pb asetat 0,06 M. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan dikeringkan menggunakan oven dengan temperatur 40°C. Setelah kering, ditambahkan metanol sebanyak 3 mL dan disaring dengan filter PTFE 0,2 mikron.

Uji Sampel dilakukan dengan peralatan LC ESI-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi Hypersil Gold (50mm x 2.1mm x 1.9 μm). UHPLC merk ACCELLA type 1250 buatan Thermo Scientific terdiri dari degasser vakum, pompa quartener, autosampelr termostatik dikendalikan Personal computer melalui program x-calibur 2.1. Pelarut A = 0,1% asam format dalam Air dan B = 0,1% asam formiat dalam acetonitrile. Gradient fase gerak dengan kecepatan 250 $\mu\text{L}/\text{menit}$ dengan pengaturan komposisi pada table 1. Volume injeksi pada LC adalah 2 μL . Kolom dikontrol pada 30°C, dan kompartemen autosampelr ditetapkan untuk 16°C.

Pengujian kromatografi menggunakan LC TSQ Quantum Accela 1250 system dari Thermo Scientific. Setelah pengujian kromatografi, selanjutnya dilakukan uji ESI MS/MS sebagai uji lanjutan dari LC. ESI MS/MS digunakan untuk mengetahui bentuk positif dan negatif dari massa spektrum ion sehingga dapat menentukan massa molekul dari senyawa yang diuji. Pengujian ESI MS/MS menggunakan Triple Quadrupole MS TSQ Quantum Access Max dari Thermo Scientific. ESI dan sumber ESI diatur dalam mode ion negatif. Parameter sumber ESI untuk rentang pemindaian massa adalah 100-800 dengan suhu kapiler 350°C, kecepatan aliran gas dan tekanan untuk

pendingin dan nitrogen pelengkap masing-masing adalah 10 L/menit dan 50psi. Penggunaan MS/MS Triple Q (quadrupole) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi ESI (Electrospray Ionization) dikendalikan software TSQ Tune yang dioperasikan dengan mode Positive. Penentuan kuantitas dengan metode SRM (Selected Reaction Monitoring) diatur pada 153 m/z sebagai ion precursor dan 93 m/z sebagai ion produk kuantitatif. Kondisi ionisasi ESI adalah sebagai berikut: tegangan spray 3 kV ; Suhu penguapan 250 °C; Suhu kapiler, 300 °C; nitrogen sebagai sheath gas pressure 40 psi, dan Aux gas pressure 10 psi dengan gas argon.

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

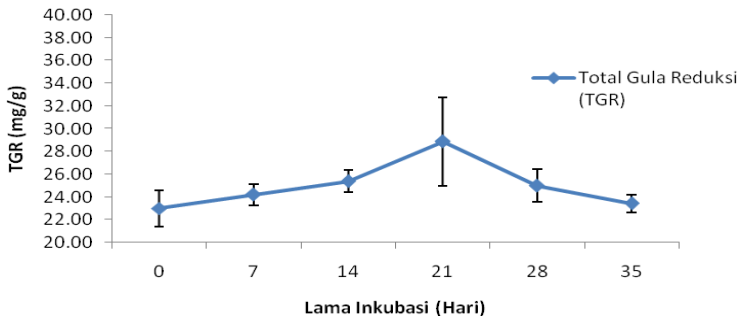
Data yang diperoleh dari pengujian ekstrak ampas pod kakao dengan faktor persentase penambahan volume pelarut etanol dan lama ekstraksi dianalisis optimasinya menggunakan *Response Surface Method* (RSM). Setelah diperoleh solusi optimal untuk hasil ekstraksi ampas pod kakao selanjutnya dilakukan pengujian identifikasi vanillin menggunakan LC-ESI-MS/MS.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstrak Pod Kakao Pada Pelarut Aquades

4.1.1 Total Gula Reduksi

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh nilai Total Gula Reduksi (TGR) hasil biodegradasi lignoselulosa pod kakao dari inkubasi hari ke-0 hingga hari ke-35 dimana rata-rata total gula reduksi pada hari ke-0 sebesar 23 mg/g dan terus meningkat sampai hari ke-21 sebesar 29,91 mg/g. Berikut **Gambar 4.1** menunjukkan grafik nilai total gula reduksi.



Gambar 4.1. Rata-rata TGR Hasil Biodegradasi Pod Kakao oleh Jamur *S.lacrymans*

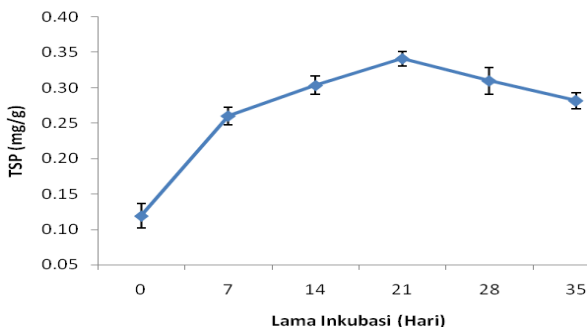
Gambar 4.1 menunjukkan rata-rata nilai TGR pada pod kakao, peningkatan total gula reduksi diperoleh pada hari ke-7 sebesar 0,26 mg/g. Meningkat kembali pada hari ke-14 dan ke-21 dengan persentase sebesar 4,87% dan 15,11% kemudian mengalami penurunan pada hari ke-28 sampai hari ke-35 dengan persentase sebesar sebesar 13,46% dan 6,29% . Diduga pada minggu ke-0 selulosa dan hemiselulosa belum terdegradasi sempurna sehingga menyebabkan nilai total gula reduksi rendah dibandingkan nilai TGR pada hari ke-7 sampai hari ke-35. Peningkatan nilai TGR diduga karena selulosa dan hemiselulosa terdegradasi lebih banyak sehingga menyebabkan nilai TGR meningkat. Menurut Tengerdy dan Szakacs (2003) pada proses *pretreatment*, gula dihasilkan dari metabolisme mikroorganisme. Jamur tersebut akan memecah dinding sel, demikian akan mengkonversi selulosa (maupun hemiselulosa) menjadi gula. Semakin lama waktu inkubasi *pretreatment* maka

semakin meningkat aksesibilitas selulosa dan hemiselulosa, sehingga semakin banyak monosakarida yang terurai.

Jamur selama pertumbuhan melakukan aktivitas seperti mendekomposisi selulosa dan hemiselulosa. Peningkatan nilai total gula reduksi diduga mengindikasikan terjadinya proses degradasi selulosa (Sanchez, 2009). Menurut Hibbett dan Donoghue (2001) penurunan nilai TGR diduga karena terjadinya perombakan senyawa. Salah satu senyawa hasil perombakan tersebut adalah senyawa glukosa, kandungan glukosa pada bahan banyak dikonsumsi oleh mikroorganisme sebagai sumber energi. Menurut Perez *et al.* (2002) produk hidrolisis selulosa banyak yang tersedia sebagai sumber karbon dan energi bagi mikroorganisme selulolitik atau mikroba lain di lingkungan dimana selulosa terdegradasi. Berdasarkan data yang diperoleh dan literatur tersebut, dapat diindikasikan gula digunakan kembali oleh mikroorganisme yang menyebabkan penurunan total gula reduksi.

4.1.2 Total Soluble Phenol (TSP)

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nilai total fenol terlarut dari inkubasi hari ke-0 hingga hari ke-35. Total fenol terlarut pada hari ke-0 sebesar 0,12 mg/g dan terus meningkat sampai hari ke-21 sebesar 0,34 mg/g kemudian mengalami penurunan sampai hari ke-35 sebesar 0,28 mg/g. Berikut **Gambar 4.2** menunjukkan grafik nilai total fenol terlarut pada pod kakao.



Gambar 4.2. Rata-rata Nilai TSP Hasil Biodegradasi Pod Kakao oleh Jamur *S. lacrymans*

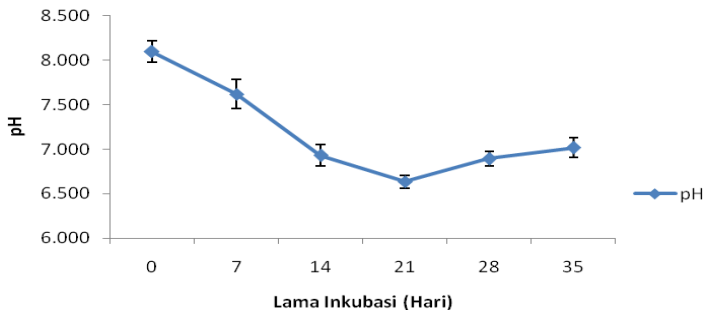
Gambar 4.2 menunjukkan rata-rata nilai TSP pada pod kakao. Peningkatan total fenol terlarut diperoleh pada hari ke-7. Kemudian meningkat pada hari ke-14 dan ke-21 dengan persentase sebesar 16,61% dan 12,39%. Selanjutnya menurun pada hari ke-28 sampai hari ke-35 dengan persentase sebesar 9,21% dan 9,08%. Menurut Conde-Mejia *et al* (2012) semakin lama waktu inkubasi diduga semakin banyak lignin yang didegradasi sehingga berpengaruh terhadap nilai TSP. Menurut Green dan Highley (2007) peningkatan nilai TSP diduga juga dipengaruhi oleh proses degradasi lignin dimana degradasi tersebut nantinya menghasilkan senyawa *monophenolic*. Salah satu senyawa *monophenolic* yang dihasilkan yaitu senyawa vanillin. Menurut Punt (2013). Senyawa *monophenolic* termasuk guaiasil (vanillin, *vanillic acid*, *acetovanillone*, *ferulic acid*), *syringyl* (syringaldehyde, asam syringic, asetosiringon), dan parahydroxyphenyl (asam p-hidroksibenzoat, asam p-coumaric, p-hidroksi benzaldehida).

Jamur pelapuk coklat lebih dulu mendegradasi selulosa dan hemiselulosa, kemudian memodifikasi lignin di akhir (Ray *et al.*, 2010). Jamur pelapuk coklat melakukan mekanisme degradasi didorong melalui modifikasi struktur lignin (Green dan Highley, 2007) dimana pada proses tersebut akan dihasilkan residu fenolik lignin (Watkinson, 2012) salah satu residu fenolik pada lignin yaitu senyawa vanillin (Punt *et al.*, 2013). Menurut Goodell *et al.* (2003), hidroksil radikal dapat memecah polimer aromatik fenol pada lignin dimana nantinya pemecahan polimer aromatik akan dihasilkan senyawa vanillin. Jadi, lignin perlu waktu untuk terdegradasi menjadi senyawa yang berguna salah satunya senyawa fenol. Nilai TSP juga mengalami penurunan, penurunan nilai *total soluble phenol* (TSP) diindikasikan karena kurangnya nutrisi pada mikroorganisme. Menurut Tuomela *et al.* (2000), bahwa mikroorganisme membutuhkan elemen nutrisi untuk pertumbuhannya.

4.1.3 pH

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh nilai pH hasil biodegradasi lignoselulosa pod kakao dari inkubasi hari ke-0 hingga hari ke-35. Nilai pH mengalami penurunan pada hari ke-0 sampai hari ke-21 dimana pH pada hari ke-0 sebesar 8,093

dan hari ke-21 sebesar 6,593 dan mengalami peningkatan kembali sampai hari ke-35 yaitu sebesar 7,017. **Gambar 4.3** menunjukkan grafik nilai pH pada pod kakao.

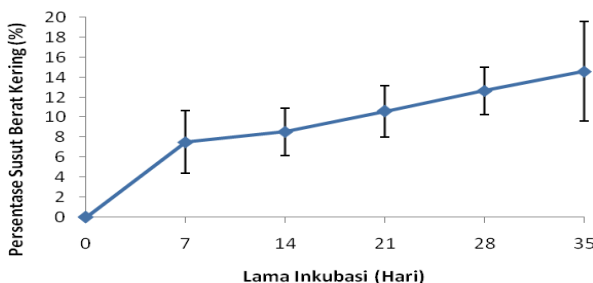


Gambar 4.3 Rata-rata nilai pH Hasil Biodegradasi Pod Kakao oleh Jamur *S. lacrymans*

Gambar 4.3 menunjukkan nilai pH pada pod kakao, selama pertumbuhan jamur pelapuk coklat menurunkan pH. Penurunan pH ini dikarenakan adanya produksi asam organik yaitu asam oksalat yang diproduksi oleh jamur pelapuk coklat dalam jumlah besar (Jellison, 2007). Penurunan nilai pH diduga karena jamur memiliki kemampuan membentuk asam-asam organik sehingga dapat menurunkan pH salah satu asam organik yang dihasilkan yaitu asam oksalat (Sugoro, 2011). Jamur pelapuk coklat pada awalnya menghasilkan asam oksalat yang menjadikan adanya kondisi asam sehingga menurunkan nilai pH. pH naik pada hari ke-28 disebabkan jamur pelapuk coklat dapat menurunkan tingkat oksalat yang dihasilkan. Menurut Schilling dan Jellison (2005), jamur pelapuk coklat diketahui dapat menurunkan tingkat oksalat jika oksalat yang ada berlebihan melalui *oxalatedecarboxylase* (ODC). Tingkat optimasi oksalat dibutuhkan oleh jamur pelapuk coklat untuk menyeimbangkan reaksi Fenton dan meminimalkan kerusakan oksidatif pada enzim dan hifa (Varela dan Tien, 2003).

4.1.4 Persentase Susut Berat Kering

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nilai persentase susut berat kering hasil biodegradasi lignoselulosa pod kakao dari lama inkubasi hari ke-0 hingga hari ke-35. Peningkatan persentase susut berat kering diperoleh pada hari ke-7 dan meningkat pada hari ke-14 sampai hari ke-21 dengan persentase sebesar 9% dan 11%. Kemudian terus meningkat pada hari ke-28 sampai hari ke-35 dengan persentase sebesar 14% dan 15%. **Gambar 4.4** menunjukkan grafik persentase susut berat bahan pod kakao.



Gambar 4.4. Rata-rata Persentase Susut Berat Hasil Biodegradasi Pod Kakao oleh Jamur *S.lacrymans*

Gambar 4.4 dapat dilihat bahwa nilai persentase susut berat bahan pod kakao mengalami peningkatan setiap minggu. Peningkatan persentase tersebut disebabkan karena semakin lamanya inkubasi sehingga kerusakan media bahan pod kakao semakin meningkat. Menurut Antai dan Crawford (1982) kehilangan berat pada proses degradasi mencerminkan adanya kerusakan dinding sel akibat metabolisme jamur. Menurut Toumela (1983), ketika terjadi delignifikasi oleh jamur biasanya selama hidrolisis enzimatis struktur bahan terurai dan menjadi lebih sedikit dan terbentuk suspensi yang agak halus. Adanya struktur bahan yang terurai maka akan menyebabkan penurunan susut berat bahan, sehingga persentase susut berat bahan mengalami kenaikan.

4.2 Hasil Analisa Desain Komposit Terpusat

Penelitian ini bertujuan mengoptimalkan senyawa yang diduga vanillin pada pod kakao dengan olah data *Response Surface Methodology* (RSM). Respon yang diamati adalah kadar vanillin dan fenol terlarut etanol. Hasil pengujian terhadap respon dimasukkan ke dalam program Design Expert 7.0.1 trial version untuk dilakukan optimasi agar mendapatkan kondisi terbaik. Optimasi faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi dilakukan pada lama inkubasi hari ke-21. Pemilihan lama inkubasi didasarkan rata-rata nilai Total *Soluble Phenol* (TSP) tertinggi yang telah dilakukan pengujian sebelumnya.

4.2.1 Analisa Respon Kadar Vanilin

Hasil esktraksi ampas pod kakao menggunakan pelarut etanol dengan lama ekstraksi yang bervariasi menghasilkan kadar vanilin tertinggi 0,45% diperoleh dari proses ekstraksi 40 ml pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 240 menit. Hasil pengujian kadar vanilin dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1. Data Optimasi Respon Persentase Kadar Vanilin Hasil Ekstraksi Ampas Pod Kakao oleh Jamur *Serpula lacrymans*

Variabel Kode		Variabel Asli		Respon Persentase Kadar Vanillin (%)
X ₁ (Volume Pelarut Etanol)	X ₂ (Lama Ekstraksi)	Volume Pelarut Etanol 99,7% (ml)	Lama Ekstraksi (menit)	
-1	-1	20	120	0,17
1	-1	60	120	0,21
-1	1	20	360	0,16
1	1	60	360	0,18
-1,414	0	11,72	240	0,20
1,414	0	68,28	240	0,19
0	-1,414	40	70,32	0,24
0	1,414	40	409,68	0,30
0	0	40	240	0,42
0	0	40	240	0,42
0	0	40	240	0,43
0	0	40	240	0,44
0	0	40	240	0,45

Model yang terpilih untuk respon persentase kadar vanillin pada fit summary yaitu model kuadratik dengan nilai R squared sebesar 0,9460 artinya sebesar 94,60% volume pelarut dan lama ekstraksi mempengaruhi kadar vanillin sedangkan 5,4% sisanya dipengaruhi oleh faktor lain diluar penelitian. Berdasarkan hasil uji ANOVA (**Lampiran 12**) diketahui bahwa nilai p model sebesar $0,0003 < 0,05$ sehingga model dikatakan signifikan dimana artinya semua hasil kadar vanilin dianggap memiliki kadar yang berbeda satu sama lain. Model memiliki bentuk yang signifikan sehingga dapat menggambarkan pola yang ada. Persamaan polinomial dalam 2 bentuk, yaitu variabel kode dan aktual.

Persamaan polinomial dalam bentuk variabel kode pada respon kadar vanilin sebagai berikut:

$$Y = 0,43 + 3,93(10^{-3})X_1 + 6,88(10^{-3})X_2 - 0,08X_1X_2 - 0,13X_1^2 - 0,09X_2^2 \dots\dots\dots(3)$$

Berdasarkan persamaan 3 terlihat koefisien dari faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi yang memiliki nilai positif dimana artinya, nilai positif dapat memberikan pengaruh baik pada respon seperti menaikkan hasil respon. Koefisien pada lama ekstraksi (X_2) memiliki nilai positif dengan angka yang lebih tinggi daripada koefesien persentase lama ekstraksi (X_1), menunjukkan bahwa kadar vanillin lebih dipengaruhi oleh lama ekstraksi daripada persentase volume pelarut etanol. Koefesien korelasi (r^2) 0,82 artinya nilai korelasi antara penambahan volume pelarut etanol dan lama waktu ekstraksi sangat kuat. Hubungan volume pelarut etanol dan lama ekstraksi terhadap respon yang diduga kadar vanilin digambarkan dalam plot tiga dimensi respon permukaan (**Gambar 4.5**).

Persamaan polinomial dalam bentuk variabel aktual asebagai berikut:

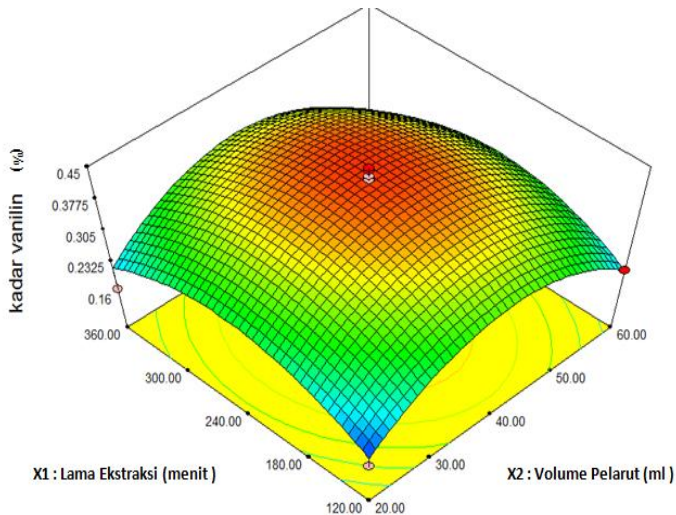
$$Y = -0,51 + 0,02(10^{-3})X_1 + 3,24(10^{-3})X_2 - 3,33(10^{-6})X_1X_2 - 3,30(10^{-4})X_1^2 - 6,36(10^{-6})X_2^2 \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

Y = Kadar Vanilin (%)

X1 = Volume Pelarut Etanol (ml)

X2 = Lama Ekstraksi (menit)



Gambar 4.5 Plot Tiga Dimensi Respon Permukaan Kadar Vanillin

Gambar 4.5 menunjukkan kontur melengkung ke atas mengindikasikan nilai kadar vanillin semakin besar. Kemudian kontur mulai menurun seiring bertambahnya volume pelarut dan lama ekstraksi. Keadaan tersebut diduga karena larutan sudah memasuki titik jenuh larutan akibat pengaruh lama ekstraksi sehingga tidak dapat menghasilkan senyawa yang diduga vanillin lebih banyak lagi, meskipun jumlah pelarut bertambah. Nilai kadar vanillin mengalami peningkatan antara rentang volume pelarut etanol sebanyak 30 ml sampai 50 ml dan lama ekstraksi 180 menit sampai 300 menit. Titik jenuh pada penelitian ini terjadi saat volume pelarut etanol 41,42 ml dengan lama ekstraksi 241,71 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan persentase volume pelarut etanol dan lama waktu ekstraksi tidak meningkatkan kadar vanillin yang diperoleh dari ampas pod kakao, hasil tersebut digambarkan dalam plot tiga dimensi respon permukaan pada **Gambar 4.5**.

Titik jenuh larutan adalah suatu titik ketika penambahan partikel terlarut sudah tidak dapat menyebabkan partikel tersebut melarut. Hal tersebut didukung oleh penelitian Handayani (2016) pada penelitiannya yang menggunakan faktor pelarut etanol dan lama ekstraksi untuk mengetahui total fenol pada daun sirsak, diduga penggunaan volume pelarut berlebih

mengakibatkan penurunan kadar senyawa yang diinginkan. Selain itu semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan bahan untuk kontak dengan pelarut semakin besar sehingga hasilnya juga akan bertambah sampai titik jenuh larutan. Komponen bahan yang terekstrak akan terus meningkat hingga larutan menjadi jenuh, setelah melewati titik jenuh larutan, tidak akan terjadi peningkatan hasil meskipun dengan penambahan pelarut. Berdasarkan uraian sebelumnya menunjukkan bahwa kadar vanillin lebih dipengaruhi oleh faktor lama ekstraksi daripada volume pelarut etanol. Menurut Misran (2003), kadar vanili pada tanaman vanilla dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya lama perendaman pada pelarut, ukuran bahan dan konsentrasi pelarut.

4.2.2 Analisa Respon Fenol Terlarut (Menggunakan Pelarut Etanol)

Fenol terlarut menggunakan pelarut etanol bertujuan untuk mengetahui senyawa yang tidak larut dalam aquades dimana digunakan pelarut etanol untuk mengetahui jumlah fenol pada ampas pod kakao. Berdasarkan hasil ekstraksi ampas pod kakao menggunakan pelarut etanol, diketahui bahwa nilai fenol terlarut menggunakan pelarut etanol tertinggi yaitu $1,92 \mu\text{g/g}$ diperoleh dari proses ekstraksi 40 ml pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 240 menit. Model yang terpilih untuk respon fenol terlarut menggunakan pelarut etanol pada fit summary yaitu model kuadratik dengan nilai R^2 sebesar 0,9610 artinya faktor volume pelarut dan lama ekstraksi mempengaruhi respon fenol terlarut menggunakan pelarut etanol sebesar 96,1%. Hasil pengujian fenol terlarut menggunakan pelarut etanol dapat dilihat pada **Tabel 4.2**. Hasil analisis ragam ANOVA untuk respon fenol terlarut menggunakan pelarut etanol dapat dilihat pada (**Lampiran 13**) Nilai p dari model sebesar 0,001 ($p > 0,05$) yang menunjukkan model signifikan. Hasil ANOVA untuk faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi diperoleh nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan bahwa faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi berpengaruh secara signifikan terhadap respon fenol terlarut menggunakan pelarut etanol.

Tabel 4.2. Data Optimasi Respon Fenol Terlarut Etanol Hasil Ekstraksi Ampas Pod Kakao oleh Jamur *Serpula lacrymans*

Variabel Kode		Variabel Asli		Fenol Terlarut Etanol (µg/g)
X ₁ (Volume Pelarut Etanol)	X ₂ (Lama Ekstraksi)	Volume Pelarut Etanol (ml)	Lama Ekstraksi (menit)	
-1	-1	20	120	0,13
1	-1	60	120	0,81
-1	1	20	360	0,12
1	1	60	360	0,51
-1,414	0	11,72	240	0,14
1,414	0	68,28	240	0,62
0	-1,414	40	70,32	0,70
0	1,414	40	409,68	1,07
0	0	40	240	1,76
0	0	40	240	1,75
0	0	40	240	1,81
0	0	40	240	1,89
0	0	40	240	1,92

Analisis ragam (ANOVA) menghasilkan persamaan polinomial 2 bentuk yaitu variabel kode dan aktual. Persamaan polinomial bentuk variabel kode sebagai berikut:

$$Y = 1,83 + 0,22X_1 + 0,02X_2 - 0,07X_1X_2 - 0,78X_1^2 - 0,53 X_2^2 \dots (5)$$

Berdasarkan persamaan 5 terlihat koefisien dari faktor volume pelarut etanol dan lama ekstraksi yang memiliki nilai positif dimana artinya, nilai positif dapat memberikan pengaruh baik pada respon seperti menaikkan hasil respon. Koefisien pada lama ekstraksi (X₂) memiliki nilai positif dengan angka yang lebih tinggi daripada koefesien persentase lama ekstraksi (X₁) hal tersebut menunjukkan bahwa fenol terlarut etanol lebih dipengaruhi oleh lama ekstraksi daripada persentase volume pelarut etanol. Koefesien korelasi (r^2) 0,82 artinya nilai korelasi antara penambahan volume pelarut etanol dan lama waktu ekstraksi sangat kuat. Hubungan volume pelarut etanol dan lama ekstraksi terhadap respon fenol terlarut menggunakan pelarut etanol digambarkan dalam plot tiga dimensi respon permukaan (**Gambar 4.6**). Persamaan poli-nomial dalam bentuk variabel aktual asebagai berikut:

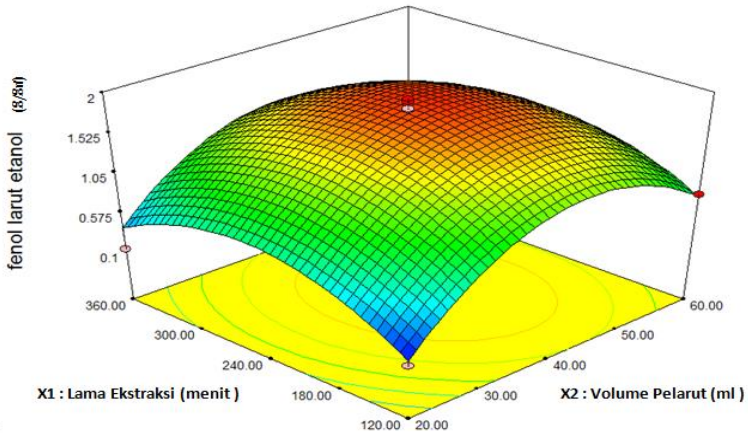
$$Y = -4,20 + 0,17X_1 + 0,01X_2 - 3,07(10^{-5})X_1X_2 - 1,95(10^{-3})X_1^2 - 3,67(10^{-5})X_2^2 \dots (6)$$

Keterangan:

Y = Fenol terlarut etanol (µg/g)

X1 = Volume Pelarut Etanol (ml)

X2 = Lama Ekstraksi (menit)



Gambar 4.6 Plot Tiga Dimensi Respon Fenol Terlarut Pelarut Etanol

Gambar 4.6 menunjukkan kontur melengkung ke atas mengindikasikan nilai fenol terlarut pelarut etanol semakin besar. Kemudian kontur mulai menurun seiring bertambahnya volume pelarut dan lama ekstraksi. Keadaan tersebut diduga karena banyak senyawa yang terlarut oleh pelarut etanol salah satunya senyawa antioksidan. Nilai fenol terlarut menggunakan pelarut etanol mengalami peningkatan antara rentang volume pelarut etanol sebanyak 30 ml sampai 50 ml dan lama ekstraksi 180 menit sampai 300 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan persentase volume pelarut etanol dan lama waktu ekstraksi tidak meningkatkan fenol terlarut menggunakan pelarut etanol yang diperoleh dari ampas pod kakao.

Berdasarkan uraian di atas menunjukkan bahwa total fenol terlarut menggunakan pelarut etanol tidak mengalami peningkatan saat volume pelarut diatas 50 ml. Hal tersebut diduga karena meningkatnya tingkat antioksidan. Menurut Khang (2016) struktur fenolik berperan penting dalam kegiatan

bioaktif terutama hubungan antara jumlah kelompok hidroksil pada struktur fenolik dengan aktivitas antioksidan, jika jumlah kelompok hidroksil bertambah maka aktivitas antioksidan akan meningkat. Oleh karena itu, diduga semakin tinggi total fenolik maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidan.

4.3 Optimasi Respon Kadar Vanilin dan Fenol Terlarut Menggunakan Pelarut Etanol

Optimasi ini dilakukan untuk mengoptimalkan respon-respon yang digunakan dalam penelitian yaitu kadar vanilin dan fenol terlarut etanol dalam batasan volume pelarut dan lama ekstraksi yang telah ditentukan. Batasan faktor yang digunakan diperoleh dari literatur sedangkan batasan respon diperoleh dari program (**Tabel 4.3**).

Tabel 4.3. Batasan Optimasi Untuk Respon Penelitian

Kriteria	Nama	Tujuan	Batas Penelitian		Kepentingan
			Atas	Bawah	
Faktor	Volume Pelarut	<i>In range</i>	20	60	4
Faktor	Lama Ekstraksi	<i>In range</i>	120	360	4
Respon	Kadar Vanilin	<i>maximum</i>	0,16	0,45	5
Respon	Fenol terlarut etanol	<i>maximum</i>	0,12	1,92	4

Keterangan:

1= Sangat Tidak Penting; 2= Tidak Penting; 3= Cukup Penting;
4= Penting; 5= Sangat Penting

Terlihat dari **Tabel 4.3** bahwa semua kriteria yang diamati memiliki bobot kepentingan yang berbeda. Komponen-komponen yang dioptimasi diberikan pembobotan kepentingan untuk mencapai tujuan diinginkan. Pembobotan kepentingan ini dinamakan kepentingan (*importance*) yang dapat dipilih mulai dari 1 (+) hingga 5 (+++++) sesuai kepentingan variabel respon. Semakin banyak tanda positif yang diberikan menunjukkan tingkat kepentingan variabel respon yang semakin tinggi (Engelen, 2015). Pada penelitian ini ditetapkan faktor volume pelarut dan lama ekstraksi dengan tingkat kepentingan masing-masing 4. Tingkat kepentingan faktor berada dibawah angka 5 dikarenakan terdapat banyak faktor lain yang mempengaruhi

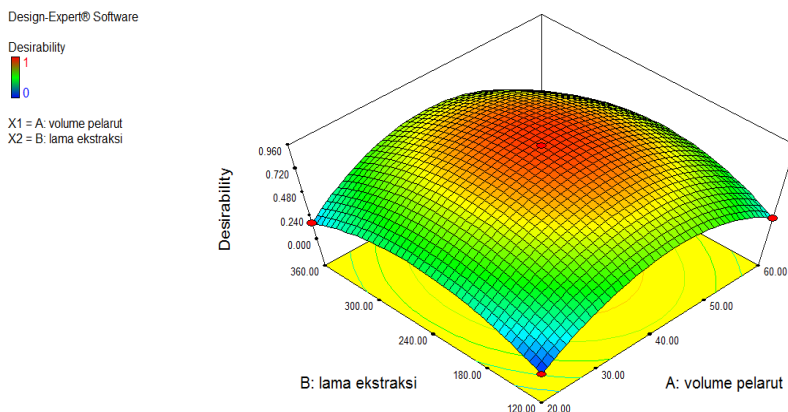
ekstraksi yang tidak digunakan pada penelitian. Menurut Rasomandary *et al* (2013) hasil ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya volume pelarut, lama ekstraksi, ukuran partikel, suhu dan konsentrasi pelarut. Sedangkan respon kadar vanillin dan fenol terlarut menggunakan pelarut etanol memiliki tingkat kepentingan masing-masing 5 dan 4. Tingkat kepentingan respon kadar vanillin bernilai 5(sangat penting) didasarkan kepentingan utama untuk mendapatkan kadar vanillin yang sebesar mungkin sedangkan respon fenol terlarut etanol memiliki tingkat kepentingan 4(penting) hal tersebut didasarkan karena banyak senyawa fenol yang larut etanol tidak hanya vanillin. Menurut Punt *et al* (2013) fenol termasuk vanillin, *vanillic acid*, *acetovanillone*, *ferulic acid*, syringaldehyde, asam syringic, asetosiringon. Berdasarkan pada batasan-batasan pada **Tabel 4.3** maka diperoleh solusi optimal pada **Tabel 4.4**.

Tabel 4.4. Solusi Hasil Optimasi

Kriteria	Parameter	Standar Prediksi
Faktor	Volume Pelarut (ml)	41,17
Faktor	Lama Ekstraksi (Menit)	243,54
Respon	Kadar Vanilin (%)	0,43
Respon	Fenol Terlarut Etanol ($\mu\text{g/g}$)	1,84
Ketepatan (<i>Desirability</i>)	-	0,95
Keterangan	-	<i>selected</i>

Solusi optimal berdasar **Tabel 4.4** menunjukkan bahwa hasil optimal diperoleh dengan perlakuan volume pelarut etanol 41,17 ml dan lama ekstraksi 243,54 menit. Perlakuan tersebut akan menghasilkan prediksi respon berupa kadar vanillin sebesar 0,43% dan fenol terlarut menggunakan pelarut etanol 1,84 ($\mu\text{g/g}$) dengan ketepatan (*desirability*) 0,951 atau 95,1%. Menurut Bezzer *et al.* (2008), *desirability* menunjukkan skala yang diinginkan untuk masing-masing respon dan menentukan derajat ketepatan hasil solusi optimal. Rentang skala untuk nilai *desirability* berkisar antara 0-1, di mana nilai 0 menunjukkan respon sepenuhnya tidak diinginkan, nilai 1 menunjukkan

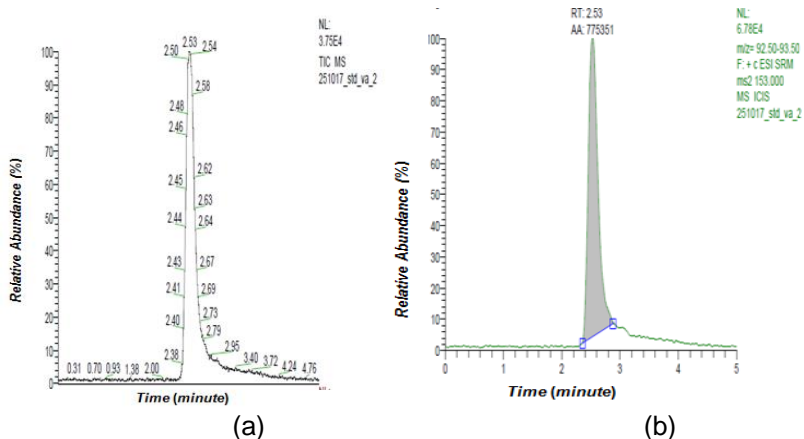
respon sepenuhnya diinginkan. Semakin mendekati nilai satu maka semakin tinggi nilai ketepatan optimasinya. Menurut Myers (2016), fungsi *desirability* adalah pengukuran skala untuk menentukan seberapa dekat responnya dapat dimaksimalkan, dikurangi, atau diberi nilai target. Hasil solusi optimal respon kadar vanillin dan Fenol terlarut menggunakan pelarut etanol dapat dilihat pada **Lampiran 14**. Hubungan volume pelarut etanol dan lama ekstraksi terhadap *desirability* digambarkan dalam plot tiga dimensi respon permukaan (**Gambar 4.6**).



Gambar 4.6 Plot Tiga Dimensi *Desirability*

4.4 Deteksi Keberadaan Vanillin

Berdasarkan hasil penelitian, solusi optimal yang diperoleh kadar vanillin tertinggi sebesar 0,447% dan fenol terlarut menggunakan pelarut etanol tertinggi sebesar 0,00193 mg/g diperoleh dari proses ekstraksi 40 ml pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 240 menit. Sampel tersebut diuji menggunakan LC-ESI-MS/MS untuk mendeteksi keberadaan senyawa fenolik vanillin.

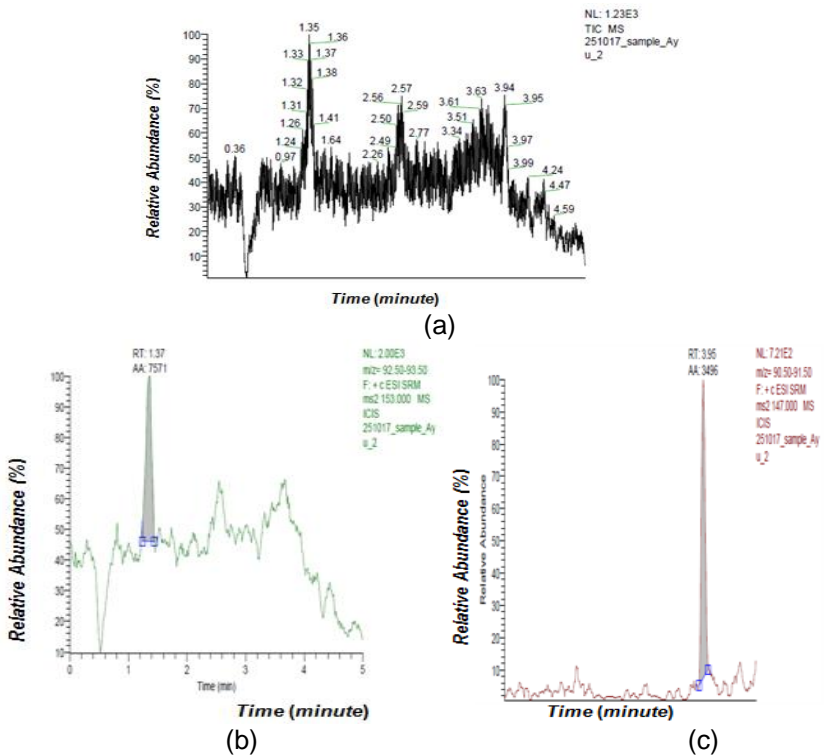


Gambar 4.7 Hasil kromatogram standar vanillin

Gambar 4.7a menunjukkan hasil kromatogram LC-ESI MS/MS standar vanillin berdasarkan pada ion prekursor yaitu 153.00 m/z dan **Gambar 4.7b** menunjukkan hasil kromatogram berdasarkan pada ion produk vanillin. Pendeteksian komponen senyawa fenolik vanillin dilakukan dengan menggunakan larutan standar. Menurut Hao dan Beta (2012), untuk mengidentifikasi monomer senyawa fenolik pada sampel dilakukan dengan membandingkan waktu retensi (*retention time*), penyerapan UV maksimum dan massa spektrum (berat molekular) dengan standar yang digunakan. Vanilin memiliki berat molekular 152 m/z. Pada proses identifikasi digunakan LC ESI-MS/MS dimana ion prekursor senyawa vanillin sebesar 153.00 m/z dan ion produk vanillin sebesar 92.50-93.50 m/z yang diperoleh dari *database massbank*. Ion precursor merupakan induk ion senyawa analitik yang diperoleh dengan mengurangi satu atau menambah satu berat molekular dari setiap senyawa. Ion produk berfungsi sebagai informasi yang bersifat kuantisasi dimana senyawa dengan berat molekular tersebut terdeteksi oleh alat dalam bentuk peak dan mengkonfirmasi bahwa peak yang dihasilkan memiliki senyawa yang diinginkan (Ginting, 2012).

Mekanisme terbentuknya vanillin diawali dengan adanya degradasi lignoselulosa dimana lignoselulosa terdiri dari tiga komponen utama yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin (Perez *et al.*, 2002). Konversi lignin menggunakan agen pendegradasi

dapat menghasilkan beberapa senyawa aromatik *monophenolic* seperti senyawa yang diduga vanillin (Jong *et al.*, 2014). Senyawa *monophenolic* termasuk guaiasil (vanillin, *vanillic acid*, *acetovanillone*, *ferulic acid*), *syringyl* (syringaldehyde, asam syringic, asetosiringon), dan parahydroxyphenyl (asam p-hidroksibenzoat, asam p-coumaric, p-hidroksi benzaldehida) (Punt *et al.*, 2013). Senyawa fenol yang terdapat pada tanaman seperti senyawa *conyferaldehyde*, *isovanillin*, *sryngaldehyde*, *asam p-coumaric* (Yi *et al.*, 2010). Jamur pelapuk coklat memodifikasi lignin dan mendegradasi senyawa selulosa dan hemiselulosa membuat struktur bahan lebih sederhana, mudah mengalami proses pirolisis aromatik (Fan *et al.*, 2011) untuk mendukung identifikasi keberadaan senyawa vanillin dilakukan uji sampel ekstrak pod kakao. Berikut hasil kromatogram sampel ekstrak pod kakao menggunakan LC-ESI-MS/MS.



Gambar 4.8 Hasil kromatogram sampel ekstrak pod kakao

Gambar 4.8a menunjukkan hasil kromatogram LC-ESI MS/MS ekstrak pod kakao berdasarkan pada ion prekursor 153.00 m/z sedangkan **Gambar 4.8b** dan **4.8c** menunjukkan senyawa analitik yang terdeteksi. Deteksi keberadaan vanillin pada ekstrak pod kakao dilakukan dengan membandingkan waktu retensi sampel ekstrak pod kakao dengan standar vanillin. Berdasarkan **Gambar 4.8b** menunjukkan bahwa terdeteksi senyawa dengan berat molekul 153.00 m/z pada ekstrak pod kakao dengan waktu retensi 1,37 menit dari total waktu 5 menit. Waktu retensi berbeda jika dibandingkan dengan waktu retensi yang terdeteksi pada standar vanillin yaitu pada waktu 2,53 menit (**Gambar 4.7b**). Sehingga jika mengacu dan dibandingkan pada waktu retensi standar vanillin yang diujikan bersama sampel, maka keberadaan vanillin tidak terdeteksi pada sampel karena waktu retensi sampel berbeda dengan retensi waktu pada standar vanillin. Berikut referensi *time retention* senyawa vanillin dan isovanilin.

Tabel 4.3 Waktu retensi vanillin

Nama Senyawa	Waktu retensi (menit)	Referensi
Vanilin	2,5	Shelton <i>et al.</i> , (2015)
Vanilin	5 sampai 6	Shen <i>et al.</i> , (2014)
Vanillin	1,31	Teseviq <i>et al.</i> , (2014)
Vanilin	7 sampai 8	Jager <i>et al.</i> , (2008)
Vanilin	1 sampai 2	Jenkins and Waite (2008)
Isovanilin	3 sampai 4 menit	Liu <i>et al.</i> , (2015)
Isovanilin	1 sampai 2 menit	Meyer <i>et al.</i> , (1999)
Isovanilin	1,37 menit	(Ayu, 2018)

Diduga senyawa yang terdeteksi pada sampel dengan berat molekul 153.00 m/z dengan waktu retensi 1,37 menit merupakan isomer vanillin yang diduga isovanilin. Deteksi keberadaan vanillin tidak terdeteksi diduga karena isomer vanillin yang terdeteksi terlebih dahulu, hal tersebut diperoleh dari hasil LCMS dimana waktu retensi sampel berbeda dengan retensi waktu pada standar vanillin. Menurut Sardjono (2008) isomer adalah suatu senyawa dari beberapa senyawa yang

mempunyai rumus molekul yang sama, tetapi mempunyai sifat berbeda akibat perbedaan susunan atom-atomnya. Dengan kata lain, isomer adalah suatu senyawa dari beberapa senyawa berbeda yang mempunyai rumus molekul sama dan masa molekul sama tetapi struktur kimianya berbeda.

Hasil kromatogram terdapat dua puncak senyawa yang terdeteksi pada sampel ekstrak pod kakao. Kedua komponen tersebut diduga isomer vanillin yaitu isovanilin (gambar 4.8b) dan senyawa lain yang mempunyai berat molekul 147 m/z (gambar 4.8c). Menurut Sarifudin (2002) dilihat dari struktur kimianya, vanillin merupakan senyawa fenol tersubsitusi gugus metoksi pada posisi *orto* dan gugus aldehida pada posisi *para*. Menurut Beedham (2005) meskipun vanillin dan isovanilin memiliki struktur aldehid fenolik yang sama tapi memiliki letak struktur yang berbeda, pada faktanya kedua isomer ini memiliki jalur metabolisme yang bervariasi dimana vanillin dimetabolisme oleh aldehid dehidrogenase. Menurut Egawa (2006) isovanillin berbeda dari vanillin, dipol listrik dari kelompok vanili dan aldehida isovanillin terletak pada ikatan C7=O8 dengan muatan positif pada posisi atom C7. Di sisi lain, dipol listrik dari atom vanillin memiliki magnitudo yang sebanding dan terletak kira-kira pada ikatan C3-C4 dengan posisi positif pada posisi atom C3. Vanillin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida) dan isovanillin (3-hidroksi-4-metoksibenzaldehida). Senyawa yang diduga isovanilin tersebut didukung dengan adanya penelitian Egawa *et al* (2006) penentuan struktur vanillin, isovanillin dan ethylvanillin dengan cara difraksi elektron gas dan perhitungan secara teoritis. Menurut hasil penelitiannya, vanillin dan ethylvanillin memiliki bau seperti vanili tetapi isovanilin hampir tidak memiliki bau seperti vanillin.

Berdasarkan uraian di atas, keberadaan vanillin tidak terdeteksi pada sampel ekstrak ampas pod kakao karena waktu retensi sampel berbeda dengan waktu retensi pada standar vanillin meskipun berat molekul yang terdeteksi sama dengan berat molekul vanilin. Pada beberapa penelitian waktu retensi vanillin terdeteksi pada menit yang berbeda (**Tabel 4.3**). Pada penelitian ini vanillin tidak terdeteksi, diduga senyawa yang terdeteksi pada waktu retensi 1,37 menit dengan berat molekul 153 m/z yaitu isomer vanillin atau isovanilin.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Optimasi ekstraksi pod kakao oleh jamur *Serpula lacrymans* dilakukan pada lama inkubasi ke-21 hari dengan respon kadar vanillin dan fenol larut etanol. Faktor optimasi pada penelitian berupa persentase penambahan pelarut etanol dan lama waktu ekstraksi. Optimasi yang dihasilkan adalah maksimasi dimana solusi optimal menunjukkan penambahan volume pelarut etanol 41,17 ml dan lama ekstraksi 243,54 menit akan menghasilkan prediksi respon berupa kadar senyawa yang diduga vanillin sebesar 0,43% dan fenol terlarut menggunakan pelarut etanol 1,84 µg/g dengan ketepatan (*desirability*) 0,951 atau 95,1%.

Vanillin tidak terdeteksi pada ekstrak ampas pod kakao diduga karena terlalu kecil kandungan vanillin yang mampu dilarutkan oleh pelarut etanol. Pada ekstrak ampas pod kakao diduga terdeteksi isomer vanillin yaitu isovanilin, hal tersebut diperoleh dari hasil LC-ESI-MS/MS dimana retensi waktu sampel ekstrak pod kakao berbeda dengan retensi waktu pada standar vanillin. Standar vanillin terdeteksi pada retensi waktu 2.53 menit sedangkan sampel terdeteksi pada retensi waktu 1.37 menit Isomer vanillin yang terdeteksi diduga isovanilin.

5.2 Saran

Perlu dipertimbangkan penggunaan percobaan faktor lain terhadap keberadaan vanilin seperti penggunaan jenis pelarut, dalam hal ini pelarut yang disarankan untuk melarutkan vanillin lebih banyak yaitu jenis pelarut *butyl acetat*. Penelitian selanjutnya bisa mempertimbangkan jumlah bahan ataupun menggunakan bahan selain pod kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- Abuirmeileh A., Talhouni A., Alsalahat and Waldie Abed. 2015. ***Vanillin Reduces Intestinal Amooth Muscle Contractility***. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 9: 33-37.
- Afrane, Ataya M.A., Dube. 2013. ***Leaching of Caustic Potash From Cocoa Husk Ash***. Bioresource Technology 41:101–104.
- Aloisio L., Santis A., D., Spera D., Pignatelli V., Albergo R. 2014. ***Innovative of Second Generation Ethanol Production from Biomass Crops by Pichia Stipitis***. Chemical Engineering Transactions 38: 115-120.
- Amran, M., Salmah, S., Sanusi, M., Yuhazri, M., Mohamad, N., Azam, M., A., Abdullah, Z. and Mohamad, E. 2014. ***Surface Roughness Optimization in Drilling Process Using Response Surface Method (RSM)***. Sciences & Engineering 66: 29-35.
- Anindyawati T. 2009. **Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa Untuk Produksi Bioetanol**. Jurnal BS 44: 49-56.
- Anonim. 2015. **Statistik Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan 2014 BPPK Kementerian Kehutanan**. Dilihat 28 April 2017. <http://bps.go.id/hortikultura/Produksi-Tanaman-Hortikultura>
- Ansel H.C., 2009. **Pengantar Bentuk sediaan Farmasi. Edisi 4**. Halaman 96,147. UI Press. Jakarta.
- Arantes V., Qian, Y., Milagres, A. M. F.,Jellison, J., Goodell, B. 2009. ***Effect of pH and Oxalic Acid on The Reduction of Fe³⁺by a Biomimetic Chelator and on Fe³⁺ Desorption/ Adsorption on to Wood: Implications for***

Brown-rot Decay. *International Biodeterior. Biodegradation* 63: 478–483.

- Ariyani F. 2008. **Ekstraksi Minyak Atsiri dari Tanaman Sereh dengan Menggunakan Pelarut Metanol, Aseton, dan N-Heksana.** *Widya Teknik* 7: 124-133.
- Balat M. 2011. **Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials via the Biochemical Pathway : a Review.** *Energy Conversion and Management* 52: 858-875.
- Beedham C (2005). **Enzymatic Oxidation of Vanillin, Isovanillin and Protocatechuic Aldehyde with Freshly Prepared Guinea Pig Liver Slices.** *Biochemistry*.15:89-98.
- Boyaci I. 2007. **Modeling and optimization I: Usability of Response Surface Methodology.** *Journal of Food Engineering*. 78: 836-845.
- Cantone, S., Hanefeld, U., Basso, A., 2007. **Biocatalysis in Non-Conventional Media-Ionic Liquids, Supercritical Fluids And The Gas Phase.** *Green Chemistry* 9:954-971.
- Conde-Mejia, C., Jimenez-Gutierrez, A., and El-Halwagi, M. 2012. **A Comparison of Pretreatment Methods for Bioethanol Production from Lignocellulosic Material.** *Process Safety and Environmental Protection* 90:189-202
- Cruz G., L. Carrion, Huuhtanen, L. Keiski. 2012. **Production of Activated Carbon From Cocoa (Theobroma cacao) Pod Husk.** *Journal Of Civil Environment Engineering* 2:1-6.
- Dey T., Ramesh C.K. 2014. **Enhanced Production And Extraction Of Phenolic Compounds From Wheat By**

Solid-State Fermentation With Rhizopus Oryzae RCK2012. Biotechnology Reports 4:120–127.

- Dong Z., Fenglin, Fei Xu, Qinghuang W., 2014. ***Comparison of Four Kinds Of Extraction Techniques and Kinetics of Microwave-Assisted Extraction of Vanillin from Vanilla Planifolia Andrews.*** *Food Chemistry* 149:54–61.
- Dwiari S.R. 2008. **Teknologi Pangan.** Pusat Perbukuan Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Egawa T, Akiyo K and Hiroshi T. 2006. ***Structural Determination of Vanillin, Isovanillin and Ethyl-vanillin By means of Gas Electron Diffraction and Theoretical Calculations.*** 3: 92-102.
- Fan Q., Fang J and Ma X. 2011. ***Effect of Biodegradation Thermogravimetric and Chemical Characteristics of Hardwood and Softwood by Brown-Rot Fungi.*** *Bioresource Technology Journal* 53: 133-162.
- Goodell B., Nicholas D, Schultz. 2003. ***Brown-Rot Fungal Degradation of Wood.*** *Wood Deterioration and Preservation* 845:97-118
- Green F, dan Highley TL. 2007. ***Mechanism fo Brown-rot Decay: Paradigm or Paradox1.*** *International Biodeterior Biodegradation* 39:113-124.
- Guenther, E. (2007). **Minyak Atsiri Jilid I (Terjemahan).** Ui Press. Hal. 44-484.
- Handayani. 2016. **Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan : Pelarut Dan Lama Ekstraksi).** *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* 4 :262-272.
- Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G.V., Faaij, A.P.C. 2005. ***Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic***

Performance in Short-, Middle- and Long-term.
Biomass and Bioenergy 28: 384-410.

Hao, M., and T. Beta. 2012. ***Qualitative and Quantitative Analysis of The Major Phenolic Compounds as Antioxidants in Barley and Flaxseed Hulls Using HPLC/MS/MS.*** J Sci Food Agric 1: 1-7.

Hastrup, ACS. 2011. ***Aspect of Cellulose Degradation by Brown Rot Fungi: Involvement of Enzymatic and Non-enzymatic Decay Processes Including Oxalic Acid Regulation and Metal Sequestering.*** PhD Thesis. University of Copenhagen. Denmark

Holtzapple, Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y, Ladisch M. 2005. ***Features Of Promising Technologies For Pretreatment of Lignocellulosic Biomass.*** Bio-resource Technology 96:673-686.

Houghton P.J. dan A. Rahman. 2009. ***Laboratory Handbook for Fractination. USA.***

Hunt L., Larsen M.J., Winandy. ***The Alkapalp Process: Fractionation Of Variouslignocelluloses And Continuous Pulping Within Anintegrated Biorefinery Concept.*** Chemical Engineering Research And Design Journal 52: 552-675.

Iswanto.. 2008. ***Agribisnis Tanaman Perkebunan.*** Penebar Swadaya. Jakarta.

Jellison S. L, Chen Y., Fekte F. 2007. ***Regulation of Hyphal Sheath Formation and Biochelator Production by the Brown Rot Fungi Gloeophyllum trabeum and Postia placenta.*** Journal of Microbiology and Biotechnology 51:503–510.

Jenkins T andWaite M. 2008. ***Screening of Commercial Vanilla Extracts for Authenticity Using the Breeze 2 Modular HPLC System.*** Water Corporation.

- Jong E., Cazemier A. E., Field J. A., Debont J.A.M. 2014. ***Physiological role of Chlorinated aryl Alcohols Biosynthesized de novo by the white rot fungus Bjerkandera sp strain BOS55.*** Applied and Environmental Microbiology 60:271-277.
- Khang, D.T., T.N. Dung, A.A. Elzaawely, and T.D. Xuan. 2016. **Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Germinated Legumes.** Biotechnology Journal. 4:132-133.
- Kim J., Hooijdonk G.V., Faaïj A. 2014. ***Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from Gloeophyllum trabeum in lignocellulose degradation.*** Journal of Biotechnology 172:8– 45.
- Kumar P., Barret D., Delwiche M., Strove P. 2009. ***Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production.*** Industrial & Engineering Chemistry Research. 48: 3713-3729.
- Laurichese *et al.*, 2013. ***Chemical Modification Of Lignins: Towards Biobased Polymers.*** Progress in Polymer Science. 1 : 25-849.
- Liu J., Pinglin L., Qi W., Bin L., and Guoqiang L. 2015. ***The HPLC Fingerprint and Isovanillin Content of Benincasa hispida Seeds.*** Journal of Chemistry. 6: 56-58.
- Lukito, Mulyono, Tetty Y.A, Hadi S. 2012. **Panduan Lengkap Budidaya Kakao.** Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. PT Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Malherbe S., dan Cloete. 2003. ***Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and Applications.*** Environmental Science Biotechnology 1: 105-114.
- Mandal, V., Mohan, Y., and Hemalatha, S. 2007. ***Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising***

- Extraction Tool for Medicinal Plant Research.***
Pharmacognosy. 1: 7-18.
- McKendry, P. 2002. ***Energy Production from Biomass.***
Bioresource Technology 83: 37-46.
- Meyer V. R. 1999. ***Practical High Performance Liquid Chromatography.*** Chromatography. 2:75-79.
- Misran. 2003. **Panili Budidaya dan Penanganan Pasca Panen.** Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y and Ladisch M. 2005. ***Features Of Promising Technologies For Pretreatment of Lignocellulosic Biomass.*** Bioresource Technology 96:673-686.
- Mukhopadhyay M. 2002. Natural ***Ekstracts using Supercritical Carbon Dioxide.*** CRC Press. London.
- Mulyono, Tetty Y.A dan Hadi S. 2010. **Buku Pintar Budi Daya Kakao.** Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Mukhriani. 2014. **Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif.** Jurnal Kesehatan. 7:15-16.
- Myers, R.H., D.C. Montgomery, and C.M. Andersoncook. 2016. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments Fourth Edition.** John Wiley & Sons Inc. New Jersey
- Nisa C., Estiasih T., Akhmadi dan Khuluq A.D. 2010. **Ekstraksi dan Fraksinasi Fosfolipid dari Limbah Pengolahan Minyak Sawit.** Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 2: 155-156.
- Nurika, I. 2013. ***Mechanisms of Lignocellulosic Conversion by The Brown Rot Fungus Serpula lacrymans.*** Disertasi. University of Warwick. London.

- Offori C., Boateng and Lee K.T. 2013. ***The Potential Of Using Cocoa Pod Husks As Green Solid Base Catalysts For The Transesterification Of Soybean Oil Into Biodiesel: Effects Of Biodiesel On Engine Performance.*** Chemical Engineering Journal 220: 395–401.
- Onifade, Oldham A.M. and Martin. 2011. ***The Potential Application Of Cocoa Pod Husk For The Manufacture Of Caustic Potash.*** J. Agric. Technol. 2:59–61.
- Pendit D., Putu A., Zubaidah E. dan Sriherfyna F.H. 2016. **Karakteristik Fisik-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.).** Jurnal Pangan dan Agroindustri. 4: 400-409.
- Perez J., Munos-Dorado J. and De la Rubia T. And Martinez J. 2002. ***Biodegradation and Biological Treatment of Cellulose, Hemicellulose and Lignin.*** International Microbiology 5: 53-63.
- Pitt, J.I dan Hocking A.D. 2009. ***Fungi and Food Spoilage.*** Springer. New York.
- Poeloengan M., Andriani, Susan M.N., Komala I. dan Hasnita M. 2007. **Uji Daya Anti bakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Bungur (*Lagerstoremia speciosa* Pers) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* Secara In vitro.** Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 776-782
- Pranoto E. 2012. **Kajian Aktivitas Bioaktif Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Terhadap Jamur *Candida albicans*.** Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan 1: 1-8.
- Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H. 2007. ***Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural Industrial and Urban Residues.*** Resources, Conservation and Recycling 50: 1–39.

- Prawoto, Wibawa, A.B Santoso, Dradjat, E. Sulisttyowati, Satyoso, J.B Baon, J. Selamat, Dibyorachmanto dan Minnawi. 2010. **Panduan Lengkap Kakao**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Purwono, N. Aini dan Tahir. 2007. ***Structure – Antioxidant Activities Relationship Analysis Of Isoeugenol, Eugenol, Vanilin And Their Derivatives***. Indo. J. Chem 7: 61–66.
- Punt, J.P. and Ying Z. 2013. **Exometabolomics Approaches in Studying the Application of Lignocellulosic Biomass as Fermentation Feedstock**. Leiden University. 3:119-143.
- Rahardjo P. 2011. **Menghasilkan Benih dan Bibit Kakao Unggul**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rasoamandrary N., António M., Bashari M., Kingsley Masamba and Xueming ***Improved Extraction Of Vanillin 4-Hydroxy-3-Methoxybenzaldehyde From Cured Vanilla Beans Using Ultrasound-Assisted Extraction: A Comparison Of Ultrasound-Assisted And Hot Water Bath Extraction***. Food Science and Technology Journal 11:6-12.
- Reddy N and Yang Y. 2005. ***Properties and Potential Applications of Natural Cellulose Fibers Obtained from Cornhusks***. Green Chemical 7:190-195.
- Saha B., C. 2003. ***Hemicellulose Bioconversion***. Microbiology Biotechnology. 30: 279-291.
- Sanchez C. 2009. ***Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi***. Biotechnology 27: 85-194.
- Santosa, 2014. **Ekstraksi Abu Kayu Dengan Pelarut Air Menggunakan Sistem Bertahap Banyak Beraliran Silang**. Jurnal Teknik Kimia. 1:33-39.

- Sardjono, R.E. 2007. **Sintesis dan Penggunaan Tetramer Siklis Seri Kaliksresorsinarena, Alkoksikaliksarena, dan Alkenilkaliksarena Adsorpsi Kation Logam Berat**, Sains dan Sibernatika. 6: 419-425.
- Sari dan Rizka F. 2011. **Kajian Potensi Senyawa Bioaktif *Spirulina Platensis* sebagai Antioksidan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sarker S., Latif Z and Gray AI. 2006. ***Natural Products Isolation***. Food Chemistry 18:6-10.
- Sasmita. 2010. **Pirolisis Limbah Serbuk Kayu dengan Katalisator Zeolit**. Prosding Seminar Nasional Teknik Kimia. ISSN 1693-4393. Yogyakarta.
- Savy D., Antonio N, Pierluigi Mazzei, Marios Drososa and Alessandro Piccolo. 2015 ***Molecular Composition Of Water-Soluble Lignins Separated From Different Non-Food Biomasses***. Fuel Processing Technology 131:175–181
- Schilling, J.S. dan Jellison, J. 2005. ***Oxalate Regulation By Two Brown Rot Fungi Decaying Oxalate-Amended And Non-Amended Wood.Holzforschung***. 59: 681–688.
- Senjaya, Y., F dan Surakusumah, W. 2008. **Potensi Ekstrak Daun Pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) Sebagai Bioherbisida Penghambat Perkecambahan *Echinochloa colonum* L. dan *Amaranthus viridis***. Jurnal Perennial. 4: 1-9.
- Shakeel F., Nazrul, Nasir A and Siddiqui. 2015. ***Solubility and Thermodynamic Function of Vanillin In Ten Different Environmentally Benign Solvents***. Food Chemistry 180 : 244–248.
- Shelton, CT., Chi Man Ng.,Wilhad M., Perkin E. 2015. ***Analysis of Vanillin, Ethyl Vanillin, and Coumarin in Vanilla***

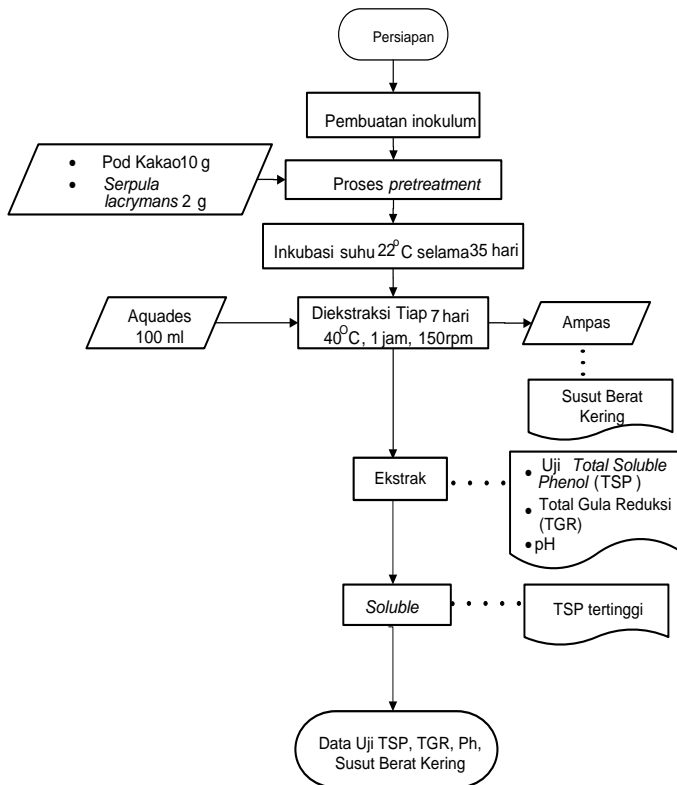
Extract Products by UHPLC with PDA Detection.
Liquid Chromatography.

- Shen, Y., and C. Han. 2014. **Determination Of Vanillin, Ethyl Vanillin, And Coumarin In Infant Formula By Liquid Chromatography-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry.** 97 :679–686.
- Simpson, Jensen K and Ryan Z. 2011. ***Extraction of Potash From Cocoa Pod Husks.*** Agric. Wastes 13 1: 69–73.
- Singleton and Rossi J.A.J. 1965. ***Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents.*** American Journal Enology Viticulture. 16: 144-158.
- Sjostrom E. 2008. **Kimia Kayu. Dasar-dasar dan Penggunaan Edisi dua (Terjemahan Dr. Hardjono Sastrohamidjojo).** Gadjah Mada University Press.
- Suwarso W.P., Sukri T. dan Wijaya. 2002. **Reaksi Penataan Ulang Sigmatropik Hidrogen Secara Termal yang Dikatalis oleh Katalis Transfer Fase (PTC) untuk Semi Sintesis Vanili dari Eugenol.** Science Journal. 6:75-78.
- Suyitno. 2009. **Petunjuk Laboratorium Rekayasa Pangan. Pengembangan Pusat Fasilitas Bersama Antar Universitas XVII.** PAU Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Taniguchi M., Suzuki H., Watanabe D., Sakai, K., Hoshino K. and Tanaka, T. 2005. ***Evaluation of Pretreatment with Pleurotusostreatus for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw.*** Journal Bioscience 100: 637–643.
- Tengerdy, R., P. and Szakacs G. 2003. ***Bioconversion of Lignocellulose in Solid Substrate Fermentation.*** Biochemical Engineering Journal. 13:169–179.

- Teseviq V., Aljancic I., Vajs V. and Zivkovic M. 2014. ***Development and Validation of An LC-MS/MS Method With A Multiple Reactions Monitoring Mode for the Quantification of Vanillin and Syringaldehyde In Plum Brandies.*** Journal of the Serbian Chemical Society. 79: 1537-1547
- Theresia H. 2009. **Penggunaan Adsorben Kanji untuk Pemisahan Kurkumin dari Kunyit Melalui Kromatografi Kolom dan Pembuatan Vanilin Melalui Degradasi Kurkumin.** Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Tuah, S. Dzoagbe and Adomako. 2015. ***Evaluation Of Cocoa Pod Husk As Feed Ingredient For Sheep in Ghana.*** International Cocoa Research Conference. 80:505–509.
- Tuomela M., Vikman M., Hatakka A. and Itavaara M. 2000. ***Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: a Review.*** Bioresource Technology. 72: 169-183.
- Varela, E. dan Tien, M. 2003. ***Effect Of Ph And Oxalate On Hydroquinone-Derived Hydroxyl Radical Formation During Brown Rot Wood Degradation.*** Appl. Environ. Microbiol. 69: 6025–6031.
- Wahyuni. 2015. **Pengaruh Jenis Pelarut Dan Lama Ekstraksi Terhadap Ekstrak Karotenoid Labu Kuning Dengan Metode Gelombang Ultrasonik.** Jurnal Pangan dan Agroindustri 3:390-401.
- Watkinson S.C. and Eastwood D.C. 2012. ***Serpula lacrymans, Wood and Buildings.*** Advanced in Applied Microbiology. 78: 121-149.
- Yi B., Lifei H., Wenli M., Kaibing Z., Hui W., Ying L., Xiaoyi, and Haofu D. 2010. ***Antioxidant Phenolic Compounds of Cassava (Manihot esculenta) from Hainan.*** Molecules Journal. 16: 10157-10167.

Lampiran 1. Tahapan Kegiatan Pelaksanaan

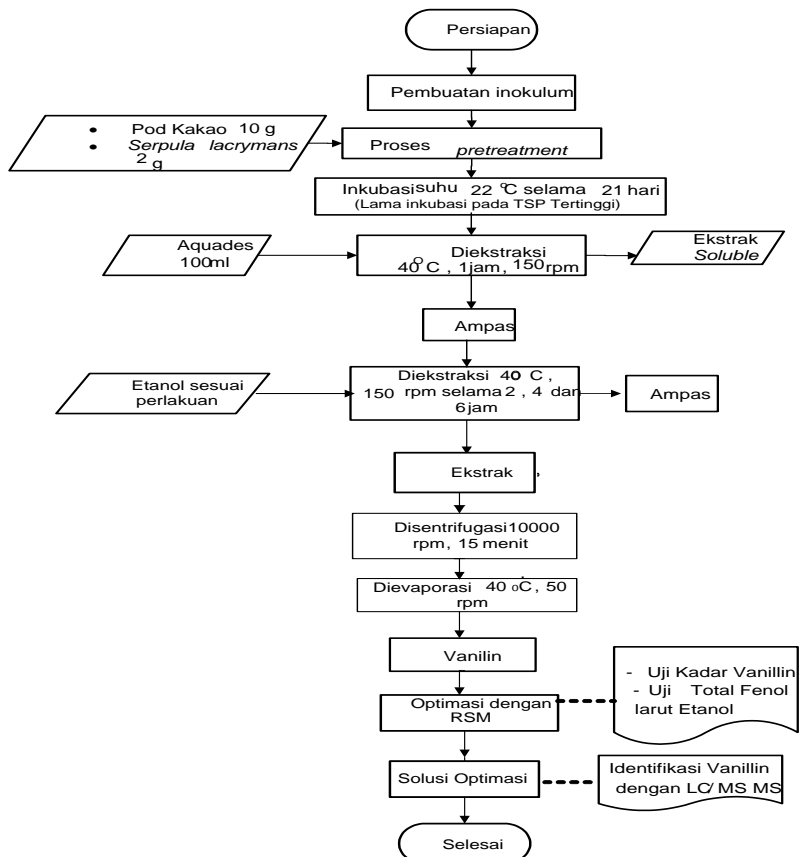
a. Percobaan I



Gambar 3.1a Diagram Alir Tahap Penelitian Percobaan I

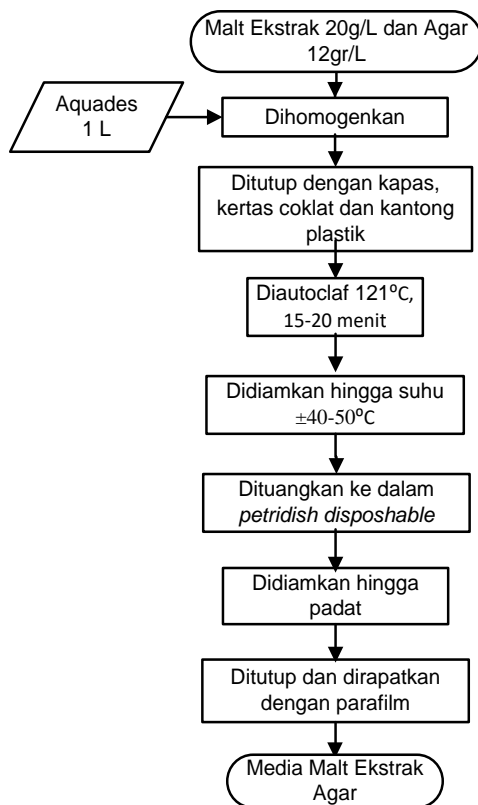
b. Percobaan II

Hasil Uji dengan lama inkubasi TSP tertinggi digunakan sebagai parameter pengamatan lama inkubasi selanjutnya untuk menguji kadar vanillin yang diduga masih terdapat pada ampas. Pada percobaan II dilakukan dua kali proses ekstraksi. Ekstraksi pertama menggunakan pelarut aquades, ekstraksi kedua menggunakan pelarut etanol.

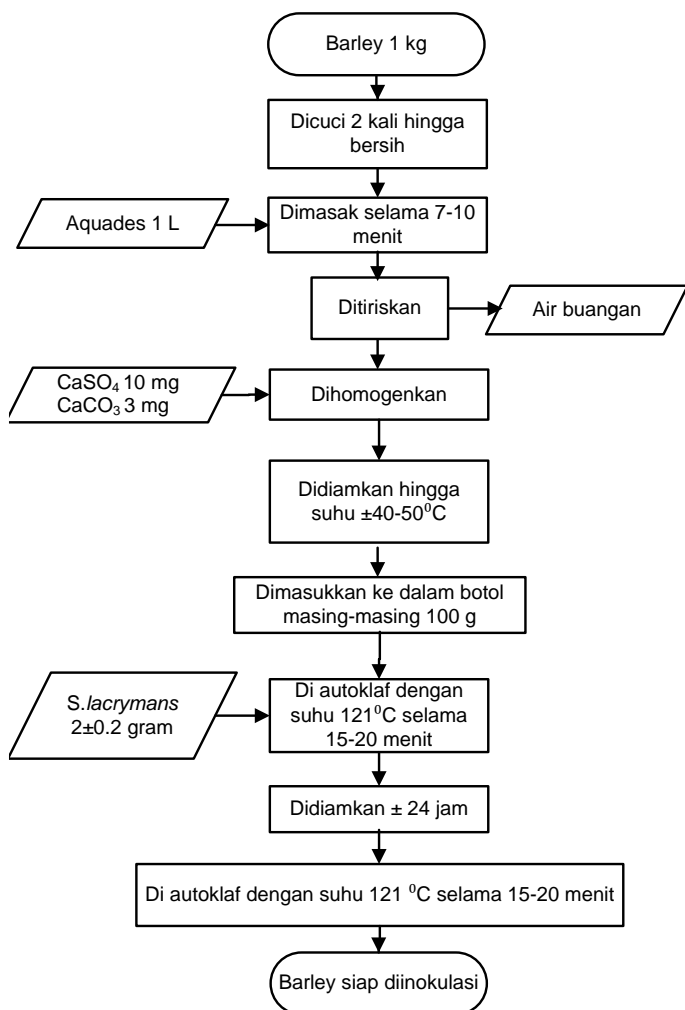


Gambar 3.1b Tahapan Penelitian Percobaan II

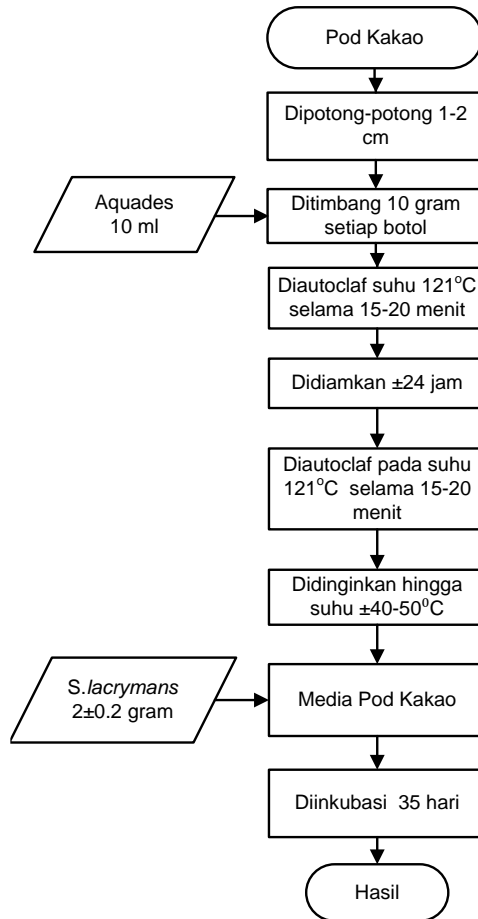
Lampiran 2. Flow chart pembuatan Malt Extract Agar (MEA)



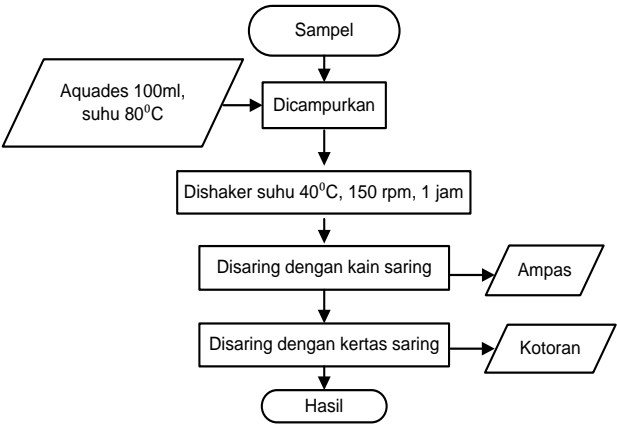
Lampiran 3. Diagram Alir Pembuatan *Grain Spawn*



Lampiran 4. Flow chart treatment dan Inokulasi pada Pod Kakao

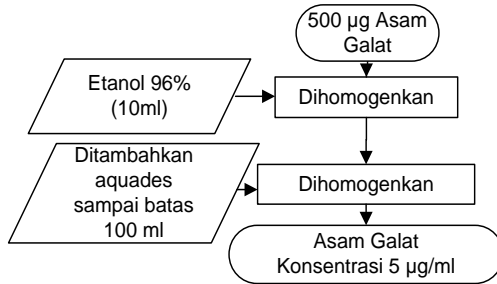


Lampiran 5. Ekstraksi Menggunakan Aquades

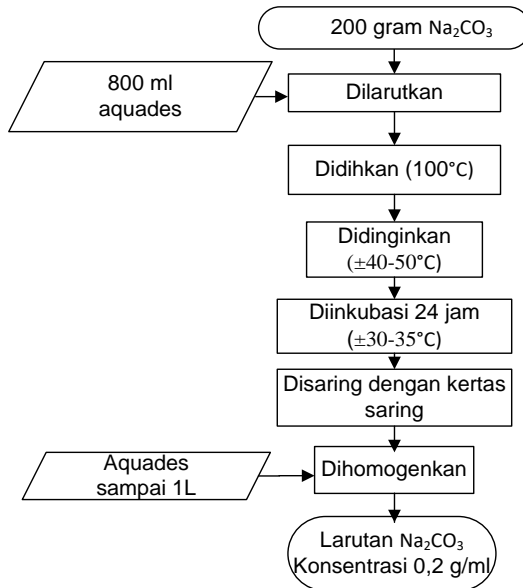


Lampiran 6. Pembuatan Larutan Asam Galat dan Sodium Karbonat

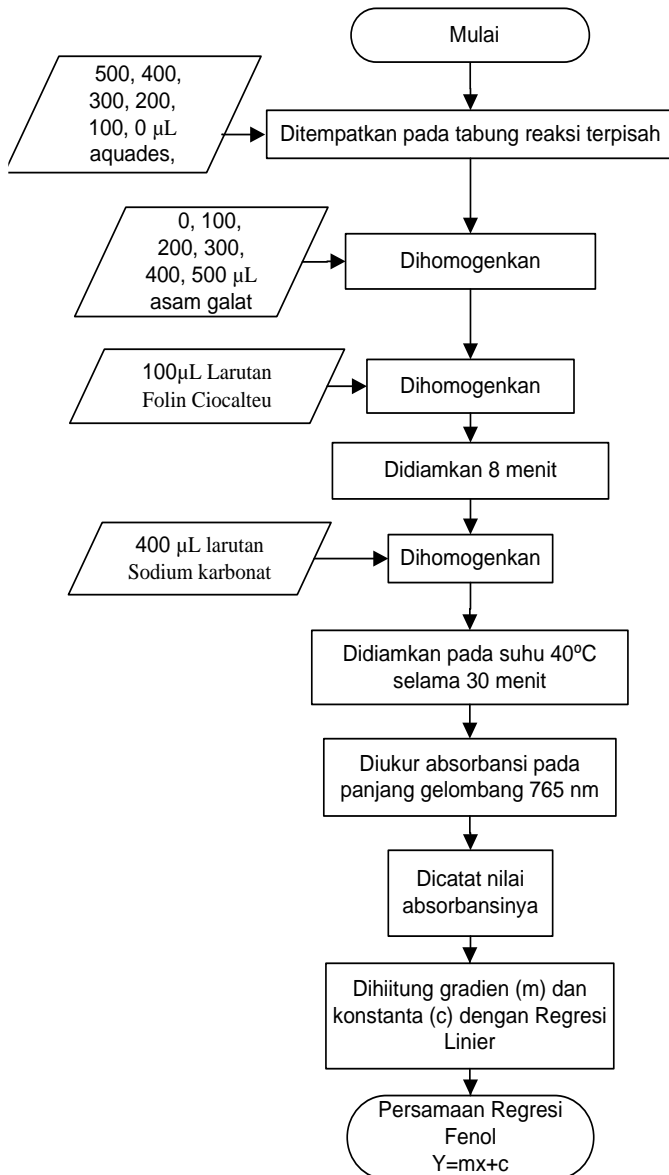
a. Larutan Asam Galat



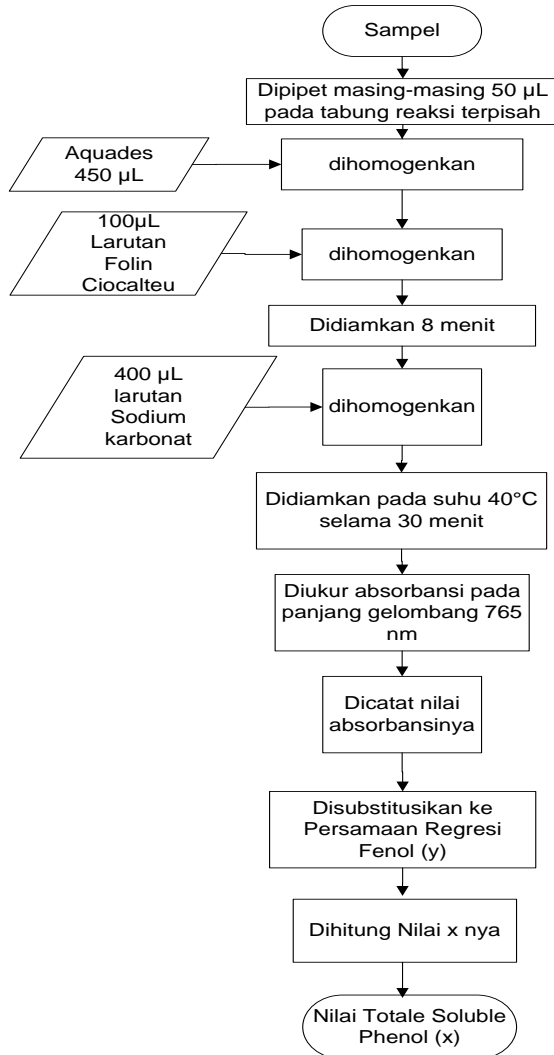
b. Larutan Sodium Karbonat



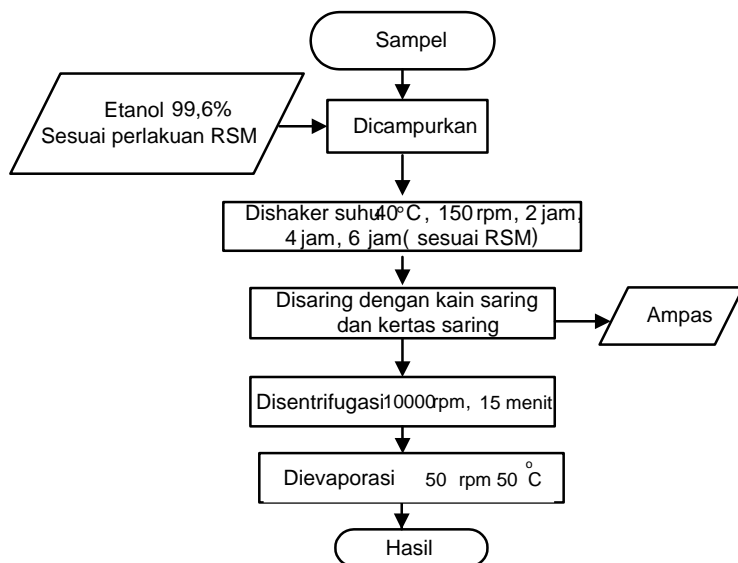
Lampiran 7. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fenol



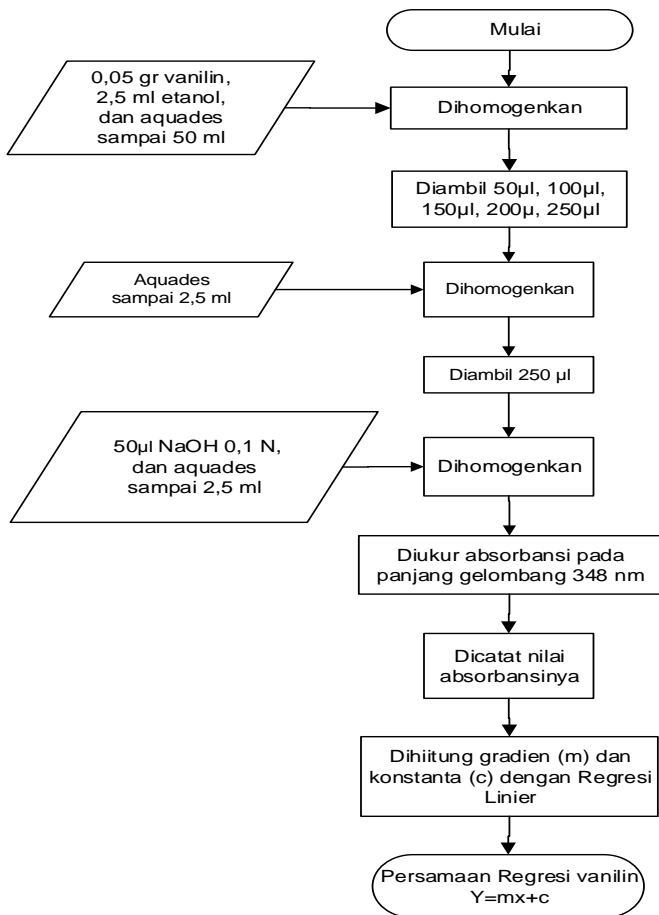
Lampiran 8. Pembuatan dan Pengukuran Fenol pada Ekstrak Pod Kakao



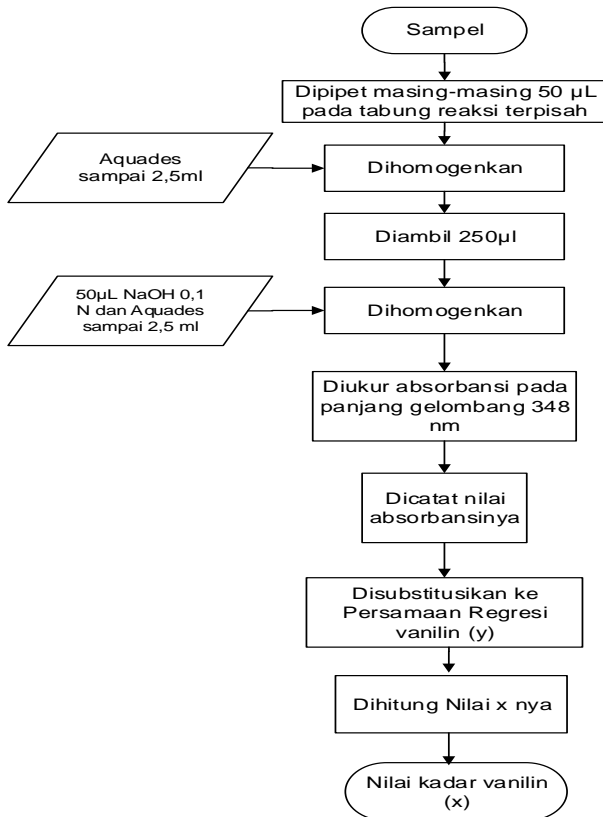
Lampiran 9. Ekstraksi Menggunakan Etanol



Lampiran 10. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Vanilin

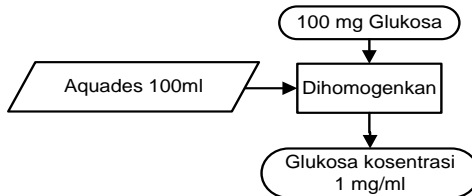


Lampiran 11. Pembuatan dan Pengukuran Vanillin Pada Ekstrak Pod Kakao

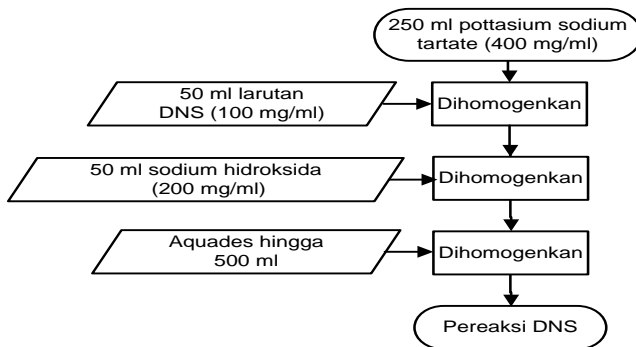


Lampiran 12. Pembuatan Larutan Glukosa, Larutan DNS, Larutan DNS dengan Glukosa dan Larutan DNS dengan aquades

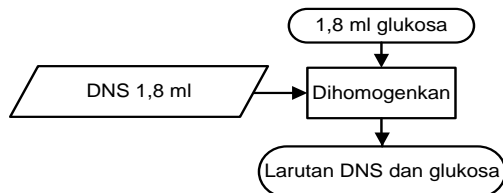
A. Pembuatan Larutan Glukosa



B. Larutan DNS

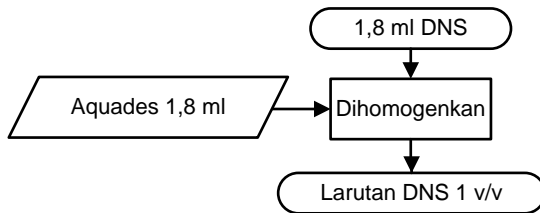


C. Larutan DNS dengan Glukosa

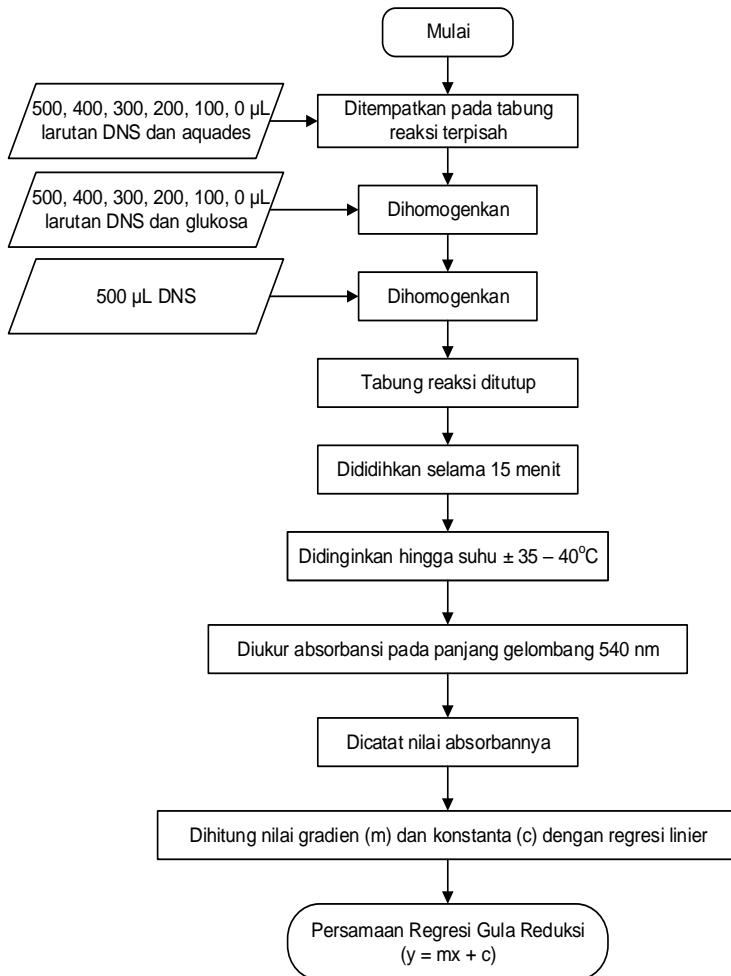


Lampiran 12. Pembuatan Larutan Glukosa, Larutan DNS,
Larutan DNS dengan Glukosa dan Larutan DNS
dengan aquades (Lanjutan)

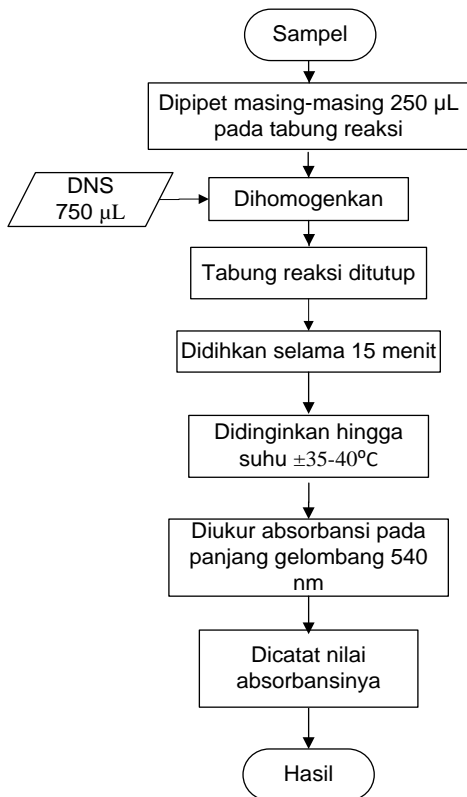
D. Larutan DNS dengan Aquades



Lampiran 13. Pembuatan dan Pengukuran Larutan Standar Gula Reduksi



Lampiran 14. Pengukuran Gula Reduksi pada Ekstrak Pod Kakao



Lampiran 15. Data Nilai TSP Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur *Serpula lacrymans* Tiap 7 hari Selama 35 Hari Inkubasi

Lama Inkubasi (Hari)	ulangan	Nilai Absorbansi	TSP ($\mu\text{l/ml}$)	TSP (mg/g)	Rata-rata TSP(mg/g)
0	1	0.12	9.85	0.10	0.10
	2	0.13	10.28	0.11	
	3	0.12	9.57	0.10	
7	1	0.30	22.50	0.24	0.25
	2	0.31	23.71	0.26	
	3	0.32	23.85	0.26	
14	1	0.33	26.46	0.29	0.30
	2	0.34	27.53	0.30	
	3	0.36	28.76	0.31	
21	1	0.40	30.28	0.33	0.33
	2	0.41	30.42	0.33	
	3	0.41	30.50	0.33	
28	1	0.33	26.61	0.29	0.31
	2	0.34	27.84	0.30	
	3	0.37	30	0.33	
35	1	0.33	24.50	0.26	0.28
	2	0.34	25.64	0.28	
	3	0.36	26.64	0.29	

Lampiran 16. Data Nilai TGR Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur *Serpula lacrymans* Tiap 7 hari selama 35 hari Inkubasi

Lama Inkubasi (Hari)	ulangan	Nilai Absorbansi	TGR (µl/ml)	TGR (mg/g)	rata-rata TGR(mg/g)
0	1	0.11	1.92	21.20	23
	2	0.16	2.20	24.26	
	3	0.15	2.13	23.53	
7	1	0.23	2.28	25.10	24.20
	2	0.22	2.20	24.20	
	3	0.21	2.11	23.30	
14	1	0.225	2.32	25.57	25.38
	2	0.21	2.20	26.23	
	3	0.211	2.21	24.32	
21	1	0.27	2.88	31.78	29.21
	2	0.17	2.04	25.46	
	3	0.25	2.76	30.38	
28	1	0.17	2.02	26.32	24.99
	2	0.18	2.04	23.48	
	3	0.17	2.01	25.16	
35	1	0.17	2.20	24.25	23.42
	2	0.16	2.11	23.27	
	3	0.15	1.99	22.72	

Lampiran 17. Data Nilai pH Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur *Serpula lacrymans* Tiap 7 hari Selama 35 Hari Inkubasi

Lama Inkubasi (Hari)	ulangan	Nilai pH	Rata-rata pH
0	1	8,19	8,09
	2	7,96	
	3	8,13	
7	1	7,56	7,61
	2	7,8	
	3	7,49	
14	1	7,04	6,93
	2	6,8	
	3	6,95	
21	1	6,56	6,63
	2	6,7	
	3	6,65	
28	1	6,89	6,89
	2	6,98	
	3	6,81	
35	1	6,97	7,01
	2	7,14	
	3	6,94	

Lampiran 18. Data Nilai Susut Berat Hasil Degradasi Pod Kakao oleh Jamur *Serpula lacrymans* Tiap 7 Hari Selama 35 hari Inkubasi

Lama Inkubasi (Hari)	ulangan	Susut Berat (%)	Rata-rata Susut Berat (%)
0	1	0	0
	2	0	
	3	0	
7	1	5	6
	2	6	
	3	8	
14	1	7	9
	2	9	
	3	10	
21	1	11	11
	2	10	
	3	13	
28	1	14	13
	2	12	
	3	14	
35	1	16	17
	2	15	
	3	20	

Lampiran 19. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat

a. Kadar Vanilin

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	1.13	1	1.13			
Linear vs Mean	5.031E-004	2	2.516E-004	0.015	0.9853	
2FI vs Linear	2.560E-004	1	2.560E-004	0.014	0.9098	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>0.16</u>	<u>2</u>	<u>0.080</u>	<u>61.03</u>	<u>< 0.0001</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadra	3.059E-003	2	1.529E-003	1.24	0.3646	Aliased
Residual	6.153E-003	5	1.231E-003			
Total	1.30	13	0.10			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.13	0.0029	-0.1965	-0.6238	0.28	
2FI	0.14	0.0045	-0.3274	-1.6593	0.45	
<u>Quadratic</u>	<u>0.036</u>	<u>0.9460</u>	<u>0.9074</u>	<u>0.6301</u>	<u>0.063</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	0.035	0.9639	0.9134	-1.1495	0.37	Aliased

"Model Summary Statistics": Focus on the model maximizing the "Adjusted R-Squared" and the "Predicted R-Squared".

Response 1 kadar vanilin

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.16	5	0.032	24.53	0.0003	significant
A-volume pelar.	1.238E-004	1	1.238E-004	0.094	0.7680	
B-lama ekstrak	3.793E-004	1	3.793E-004	0.29	0.6080	
AB	2.560E-004	1	2.560E-004	0.19	0.6725	
A ²	0.12	1	0.12	92.28	< 0.0001	
B ²	0.058	1	0.058	44.38	0.0003	

Lampiran 19. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat (lanjutan)

Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI		VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	0.43	1	0.016	0.39	0.47	
A-volume pelaru	3.934E-003	1	0.013	-0.026	0.034	1.00
B-lama ekstraks	6.886E-003	1	0.013	-0.023	0.037	1.00
AB	-8.000E-003	1	0.018	-0.051	0.035	1.00
A ²	-0.13	1	0.014	-0.16	-0.100	1.02
B ²	-0.092	1	0.014	-0.12	-0.059	1.02

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{kadar vanilin} = & \\
 & +0.43 \\
 & +3.934\text{E-}003 * A \\
 & +6.886\text{E-}003 * B \\
 & -8.000\text{E-}003 * A * B \\
 & -0.13 * A^2 \\
 & -0.092 * B^2
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{kadar vanilin} = & \\
 & -0.51571 \\
 & +0.027420 * \text{volume pelarut} \\
 & +3.24573\text{E-}003 * \text{lama ekstraksi} \\
 & -3.33333\text{E-}006 * \text{volume pelarut} * \text{lama ekstraksi} \\
 & -3.30297\text{E-}004 * \text{volume pelarut}^2 \\
 & -6.36461\text{E-}006 * \text{lama ekstraksi}^2
 \end{aligned}$$

Lampiran 19. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat (lanjutan)

b. Fenol larut etanol

Response 2 fenol larut etanol Transform: None

*** WARNING: The Cubic Model is Aliased! ***

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	13.60	1	13.60			
Linear vs Mean	0.39	2	0.19	0.33	0.7258	
2FI vs Linear	0.022	1	0.022	0.034	0.8580	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>5.56</u>	<u>2</u>	<u>2.78</u>	<u>80.38</u>	<u>< 0.0001</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadra	0.10	2	0.052	1.87	0.2477	Aliased
Residual	0.14	5	0.028			
Total	19.81	13	1.52			

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	0.76	0.0621	-0.1255	-0.5230	9.45	
2FI	0.80	0.0656	-0.2459	-1.3926	14.85	
<u>Quadratic</u>	<u>0.19</u>	<u>0.9610</u>	<u>0.9332</u>	<u>0.7444</u>	<u>1.59</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	0.17	0.9777	0.9465	-0.1838	7.35	Aliased

Response 2 fenol larut etanol

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	5.97	5	1.19	34.51	< 0.0001	significant
A-volume pelarut	0.38	1	0.38	10.99	0.0128	
B-lama ekstrak	5.306E-003	1	5.306E-003	0.15	0.7069	
AB	0.022	1	0.022	0.63	0.4528	
A ²	4.27	1	4.27	123.35	< 0.0001	
B ²	1.95	1	1.95	56.43	0.0001	

Lampiran 19. Hasil *Fit Summary* dan ANOVA dari Analisa Desain Komposit Terpusat (lanjutan)

Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI		VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	1.83	1	0.083	1.63	2.03	
A-volume pelaru	0.22	1	0.066	0.063	0.37	1.00
B-lama ekstraksi	0.026	1	0.066	-0.13	0.18	1.00
AB	-0.074	1	0.093	-0.29	0.15	1.00
A ²	-0.78	1	0.071	-0.95	-0.62	1.02
B ²	-0.53	1	0.071	-0.70	-0.36	1.02

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{fenol larut etanol} = & \\
 & +1.83 \\
 & +0.22 * A \\
 & +0.026 * B \\
 & -0.074 * A * B \\
 & -0.78 * A^2 \\
 & -0.53 * B^2
 \end{aligned}$$

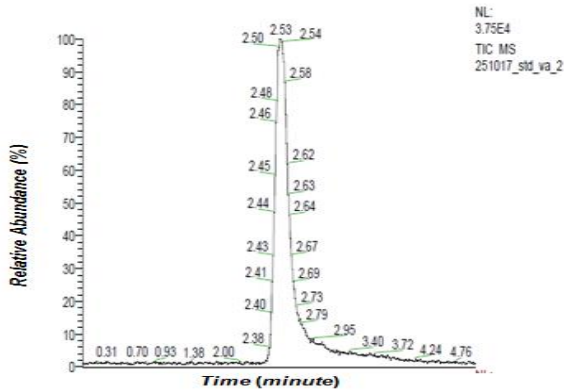
Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{fenol larut etanol} = & \\
 & -4.20324 \\
 & +0.17489 * \text{volume pelarut} \\
 & +0.019103 * \text{lama ekstraksi} \\
 & -3.07896\text{E-}005 * \text{volume pelarut} * \text{lama ekstraksi} \\
 & -1.95752\text{E-}003 * \text{volume pelarut}^2 \\
 & -3.67854\text{E-}005 * \text{lama ekstraksi}^2
 \end{aligned}$$

Lampiran 20. Batasan Response Surface Methode

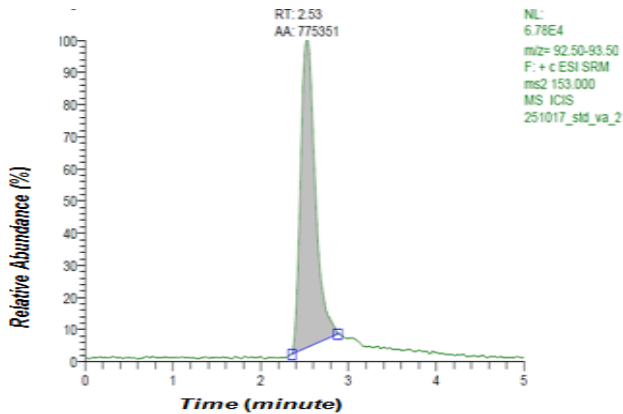


Lampiran 21. Hasil Analisis Kromatogram LC-ESI-MS/MS Standar Vanillin



(a)

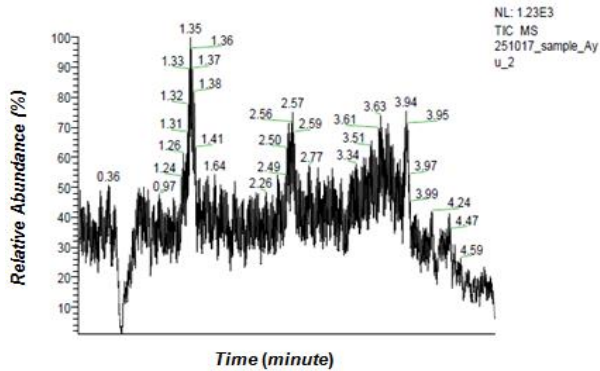
Hasil Kromatogram LCMS/MS Standar Vanillin Berdasarkan Ion Prekursor



(b)

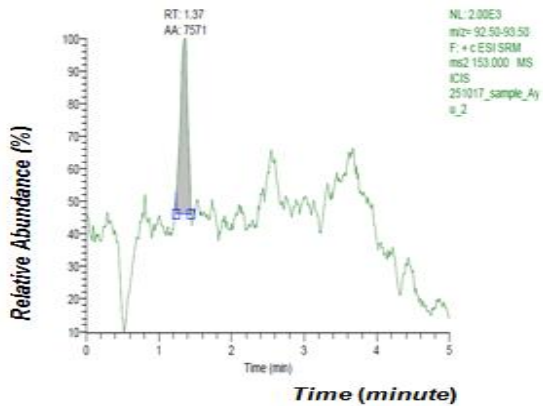
Hasil Kromatogram LCMS/MS Standar Vanillin Berdasarkan Ion Produk

Lampiran 22. Hasil Analisis Kromatogram LC-ESI-MS/MS
Sampel Ekstrak Ampas Pod Kakao



(a)

Hasil Kromatogram LCMS/MS Sampel Berdasarkan Ion
Prekursor



(b)

Hasil Kromatogram LCMS/MS Sampel Berdasarkan Ion
Produk

Lampiran 23. Dokumentasi Penelitian



Sampel sebelum
ditumbuhi jamur



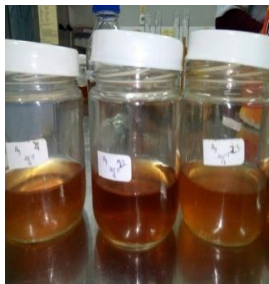
Sampel ditumbuhi
jamur hari ke-21



Barley yang ditumbuhi
jamur *S. lacrymans*



Proses filtrasi



Ekstrak dengan pelarut
aquades



Total gula reduksi



Total soluble phenol



Evaporasi



Sampel hasil
sentrifugasi